

Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular



**Interacción funcional de la eIF2 α quinasa
GCN2 con el virus de la inmunodeficiencia
humana VIH-1**

Memoria presentada por
Javier del Pino García
para optar al grado de Doctor en Ciencias

Esta tesis doctoral ha sido realizada en el Centro de Biología Molecular

Severo Ochoa bajo la dirección de los Doctores Juan José Berlanga

Chiquero y César de Haro Castilla

ÍNDICE

ABREVIATURAS	I
RESUMEN EN INGLÉS (SUMMARY)	VII

INTRODUCCIÓN	3
---------------------------	----------

1. LA TRADUCCIÓN.....	3
------------------------------	----------

1.1. EL ARN MENSAJERO	3
1.2. EL ARN TRANSFERENTE Y LAS AMINOACIL ARN _t SINTETASAS	4
1.3. EL RIBOSOMA	4
1.4. LAS ETAPAS DE LA TRADUCCIÓN	5

2. LA ETAPA DE INICIACIÓN DE LA TRADUCCIÓN.....	6
--	----------

2.1. FORMACIÓN DEL COMPLEJO DE PREINICIACIÓN 43S.....	6
2.2. ACTIVACIÓN DEL ARN _m Y RECLUTAMIENTO DEL COMPLEJO 43S	6
2.3. RASTREO DEL ARN _m Y RECONOCIMIENTO DEL CODÓN DE INICIO	9

3. REGULACIÓN DE LA TRADUCCIÓN	9
---	----------

3.1. IMPORTANCIA DEL CONTROL TRADUCCIONAL	9
3.2. DIANAS Y MECANISMOS DEL CONTROL TRADUCCIONAL.....	10
3.2.1. Regulación traduccional a través de la modificación de los factores de inicio ..	10

3.3. REGULACIÓN DE LA TRADUCCIÓN A TRAVÉS DE LA FOSFORILACIÓN DEL FACTOR eIF2	11
---	----

3.3.1. Estructura del factor eIF2.....	11
3.3.2. Función del factor eIF2	12
3.3.3. Regulación de la traducción a través de la fosforilación de eIF2 α	12
3.3.3.1. Inhibición de eIF2B.....	12
3.3.3.2. Activación de la traducción de ARN _m implicados en respuesta a estrés celular	14

3.4. eIF2 α QUINASAS	15
-----------------------------------	----

3.4.1. Inhibidor regulado por hemina (HRI)	17
3.4.2. Proteína quinasa regulada por estrés en el retículo endoplásmico (PERK) ...	18
3.4.3. Proteína quinasa regulada por ARN de doble banda (PKR)	18
3.4.4. Proteína quinasa regulada por limitación de nutrientes (GCN2)	19
3.4.5. Proteínas quinasas de <i>Schizosaccharomyces pombe</i> : Hri1 y Hri2	20

3.5. CONTROL DE LA TRADUCCIÓN DURANTE LA INFECCIÓN VIRAL	20
--	----

3.5.1.	Estrategias virales en la traducción de ARNm	22
3.5.1.1.	Síntesis de poliproteínas	22
3.5.1.2.	Sitios de iniciación internos (IRES)	22
3.5.1.3.	Otras estrategias	23
3.5.2.	Defensas antivirales y traducción	23
3.5.2.1.	Apoptosis	23
3.5.2.2.	Síntesis de interferón	24
3.5.2.3.	Activación de PKR	24
3.5.2.4.	Activación de GCN2	25
4.	<i>VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH)</i>	25
4.1.	<i>TAXONOMÍA DEL VIRUS VIH</i>	25
4.2.	<i>ESTRUCTURA Y ORGANIZACIÓN GENÓMICA</i>	26
4.2.1.	Genes estructurales	26
4.2.2.	Genes reguladores	27
4.2.3.	Genes auxiliares	28
4.3.	<i>TROPISMO Y CICLO DEL VIRUS VIH-1</i>	29
4.4.	<i>TRANSACTIVACIÓN DEL GENOMA DE VIH-1</i>	31
4.5.	<i>ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNA TAT</i>	32
5.	<i>INFECCIÓN POR VIH Y REGULACIÓN DE LA TRADUCCIÓN</i>	32
5.1.	<i>ACTIVACIÓN Y REGULACIÓN DE PKR EN RESPUESTA A ARN DE VIH-1</i> ...	33
5.1.2.	Inhibición mediante la unión de proteínas celulares a PKR	33
5.1.3.	Inhibición mediante la unión de proteínas celulares a ARN TAR de VIH-1 .	33
5.1.4.	Inhibición mediante la unión de proteínas celulares a activadores de PKR ...	34
5.1.5.	Inhibición provocada por la proteína Tat	34
5.2.	<i>INHIBICIÓN DE LA TRADUCCIÓN POR LA ACTIVIDAD DE LA PROTEASA DE VIH-1</i>	34
	<i>OBJETIVOS</i>	39
	<i>MATERIALES Y MÉTODOS</i>	43
1.	<i>BACTERIAS Y CLONACIÓN</i>	43
1.1.	<i>CEPAS Y CRECIMIENTO</i>	43
1.2.	<i>TRANSFORMACIÓN</i>	43
1.3.	<i>PURIFICACIÓN DE ADN PLASMÍDICO</i>	43
1.4.	<i>PURIFICACIÓN DE GCN2-GST</i>	44
2.	<i>MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS</i>	44

2.1.	VECTORES DE EXPRESIÓN Y CONSTRUCCIONES	44
2.2.	REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	45
2.3.	ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	45
2.4.	DIGESTIÓN ENZIMÁTICA DEL ADN Y LIGACIÓN.....	46
2.5.	SECUENCIACIÓN DE ADN	46
2.6.	TRANSCRIPCIÓN IN VITRO	46
3.	CULTIVO CELULAR	46
3.1.	LÍNEAS CELULARES.....	46
3.2.	MANTENIMIENTO Y MEDIOS DE CULTIVO.....	47
3.3.	CONGELACIÓN DE CÉLULAS.....	48
3.4.	TRANSFECCIÓN.....	48
3.4.1.	Lipofectamina y JetPEI™	48
3.4.2.	Electroporación	48
3.5.	INFECCIÓN.....	49
3.5.1.	Infección con VIH-1	49
3.5.2.	Infección con virus Vaccinia-T7	49
3.5.3.	Generación de lentivirus y silenciamiento de expresión de GCN2	49
3.6.	ENSAYO DE RADIACIÓN UV	50
3.7.	RECOGIDA DE CÉLULAS PARA ANÁLISIS	50
4.	MANIPULACIÓN DE EXTRACTOS CELULARES	50
4.1.	PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	50
4.2.	INMUNOPRECIPITACIÓN.....	50
4.3.	INCUBACIÓN CON PROTEASA DE VIH-1	50
4.4.	FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR	51
5.	ENSAYOS IN VITRO	51
5.1.	ENSAYO DE ACTIVIDAD eIF2 α QUINASA.....	51
5.2.	ENSAYO DE CORTE CON PROTEASAS DE VIH.....	51
6.	MÉTODOS DE ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS.....	52
6.1.	CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD LUCIFERASA	52
6.2.	ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS.....	52
6.3.	TINCIÓN DE COOMASSIE.....	52
6.4.	TRANSFERENCIA A MEMBRANA DE PVDF.....	52
6.5.	WESTERN BLOT	53
6.6.	CUANTIFICACIÓN POR DENSITOMETRÍA.....	54
6.7.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	54

RESULTADOS	57
1. ESTUDIO DE LA ACTIVACIÓN DE LA <i>eIF2α</i> QUINASA GCN2 EN RESPUESTA A ARN DE VIH-1.....	57
1.1. ACTIVACIÓN DE GCN2 EN RESPUESTA A ARN DE VIH-1 IN VITRO	57
1.2. ACTIVACIÓN DE GCN2 EN CÉLULAS EN LAS QUE SE EXPRESA EL ARN DE VIH-1	59
1.3. ACTIVACIÓN DE GCN2 EN CÉLULAS INFECTADAS CON VIH-1.....	61
2. ESTUDIO DE LA REGULACIÓN TRADUCCIONAL DE GCN2 SOBRE EL ARN DE VIH-1.....	62
2.1. LA REGULACIÓN DE LA TRADUCCIÓN DEL ARNm DE VIH-1 ES DEPENDIENTE DE <i>eIF2</i>	62
2.2. LA AUSENCIA DE GCN2 FAVORECE LA TRADUCCIÓN DEL ARNm DE VIH-1	64
2.3. LA SOBREENPRESIÓN DE GCN2 DISMINUYE LA TRADUCCIÓN DEL ARNm DE VIH-1	66
3. ESTUDIO DE LA DEGRADACIÓN PROTEOLÍTICA DE GCN2 POR LA PROTEASA DE VIH-1	67
3.1. SAQUINAVIR INHIBE LA DEGRADACIÓN PROTEOLÍTICA DE GCN2 EN CÉLULAS INFECTADAS POR VIH-1.....	67
3.2. LA PROTEASA DE VIH-1 DEGRADA PROTEOLÍTICAMENTE A GCN2 DE MANERA DIRECTA.....	69
3.2.1. La expresión de la proteasa de VIH-1 en células provoca la degradación de GCN2	69
3.2.2. La proteasa de VIH-1 degrada proteolíticamente a GCN2 <i>in vitro</i> y en extractos celulares	71
3.2.3. Identificación del sitio de corte de VIH-1 ^{Pro} en GCN2	72
3.3. LA DEGRADACIÓN PROTEOLÍTICA DE GCN2 POR LA PROTEASA DE VIH-1 REDUCE SIGNIFICATIVAMENTE LA ACTIVIDAD DE LA QUINASA IN VITRO	73
4. ESTUDIO DE LA INHIBICIÓN DE LA RESPUESTA A ESTRÉS DEPENDIENTE DE <i>eIF2</i> POR LA PROTEÍNA TAT	75
4.1. EFECTO INHIBITORIO DE LA PROTEÍNA TAT SOBRE LA ACTIVIDAD DE GCN2 IN VITRO	75
4.2. EFECTO INHIBITORIO SOBRE LA ACTIVIDAD DE GCN2 EN CÉLULAS QUE EXPRESAN LA PROTEÍNA TAT	78
4.3. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LA PROTEÍNA TAT.....	80
DISCUSIÓN	83

CONCLUSIONES	99
---------------------------	-----------

BIBLIOGRAFÍA	103
---------------------------	------------

ANEXO

GCN2 has inhibitory effect on human immunodeficiency virus-1 protein synthesis and is cleaved upon viral infection. PLoS ONE 7, e47272.

ABREVIATURAS

4E-BP	Proteína de unión a eIF4E
ADAR	<i>Adenosine deaminase acting on RNA</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ARN	Ácido ribonucleico
ARNdc	ARN de doble cadena
ARNi	ARN interferente
ARNm	ARN mensajero
ARNmc	ARN monocatenario
ARNr	ARN ribosómico
ARNt	ARN de transferencia
ARNt _i	ARNt iniciador
ATCC	<i>American Type Cell Collection</i>
ATF	Factor activador de la transcripción
ATP	Adenosín trifosfato
BHK	<i>Baby hamster kidney</i>
BiP	<i>Binding immunoglobulin protein</i>
BSA	Albúmina de suero bovino
°C	Grado centígrado
CHOP	<i>C/EBP homology protein</i>
COS	<i>Cells being CV-1 in origin and carrying the SV40 genetic material</i>
CREP	<i>Constitutive repressor of eIF2α phosphorylation</i>
Ct	Carboxilo terminal
Cys	Cisteína
Da	Dalton

ABREVIATURAS

DMEM	Medio <i>Eagle</i> modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetil sulfóxido
DEPC	Dietilpirocarbonato
dsRBM	RBM de unión a ADN de doble cadena
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilen-diamin-tetraacético
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
eIF	Factor de inicio de la traducción eucariótico
e.t.m.	Error típico de la media
F	Faradio
g	Gramo
GADD	<i>Growth arrest and DNA damage protein</i>
GAP	Proteína activadora de la función GTPasa
GCN	<i>General control non-derepressible</i>
GDP	Guanosín difosfato
GEF	Factor intercambiador de nucleótidos de guanina
GFP	Proteína fluorescente verde
GRP	<i>Glucose regulate protein</i>
GST	Glutation-S-transferasa
GTP	Guanosín trifosfato
HEK	<i>Human embryonic kidney</i>
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperacilil-(1)] etanosulfónico
HisRS	Histidil-ARNt sintetasa
HRI	Inhibidor regulado por hemina
Hsp	<i>Heat shock protein</i>
IFN	Interferón
IKK	<i>IκB kinase</i>

IRES	Sitio interno de entrada al ribosoma
ITAF	Factor transactivador de IRES
J	Julio
K	Lisina
kb	Kilobase
l	Litro
LB	Medio de Luria-Bertani
LTR	<i>Long terminal repeat</i>
M	Molar
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógeno
MEF	Fibroblasto embrionario de ratón
Met	Metionina
Met-ARN _t _i	Metionil ARN _t _i
MFC	Complejo multifactor
MMS	Metilmetano sulfonato
NF-κB	Factor nuclear κB
ORF	Marco abierto de lectura (<i>open reading frame</i>)
uORF	ORF anterior al codón AUG de inicio (<i>untranslated ORF</i>)
<i>p</i>	Valor de significancia
PACT	Activador de PKR
PABP	Proteína de unión a poli(A)
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBMC	Célula mononuclear de sangre periférica
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PERK	<i>PKR-like endoplasmic reticulum kinase</i>
PKR	Proteína quinasa R/Proteína quinasa dependiente de ARN

ABREVIATURAS

PIC	Complejo de preiniciación
PP1	Proteína fosfatasa 1
PP1c	Subunidad catalítica de PP1
PVDF	Difluoruro de polivinilo
R	Arginina
RBM	Motivo de unión a ARN
rpm	Revoluciones por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RRE	Elemento de respuesta a Rev
RT	Retrotranscriptasa/Transcriptasa inversa
S	Svedberg
SDS	Dodecil sulfato sódico
Ser	Serina
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SQ	Saquinavir
SV	Virus Sindbis
TAE	Tris-acetato EDTA
TAR	<i>Transactivation response region</i>
Tat	Proteína transactivadora
TBS	Tampón tris salino
TBS-T	TBS con Tween-20
TC	Complejo ternario
Thr	Treonina
TRBP	<i>TAR RNA binding protein</i>
U	Unidad
u.r.	Unidad relativa
UTR	Región no codificante (<i>untranslated region</i>)

UV	Ultravioleta
V	Voltio
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VIH ^{Pro}	Proteasa de VIH-1

RESUMEN EN INGLÉS (SUMMARY)

The reversible phosphorylation of the α -subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 (eIF2 α) is a well-characterized mechanism of translational control in response to a wide variety of cellular stresses. Four eIF2 α kinases have been characterized in mammals: GCN2, HRI, PERK and PKR. GCN2 is activated and phosphorylates eIF2 α in cells subjected to amino acid starvation conditions, high salinity, glucose limitation, ultraviolet light and viral infection by RNA viruses with central nervous system tropism. On the other hand, PKR is one of the most studied components of the IFN-induced antiviral pathways and has been involved in the antiviral response against HIV-1, although this antiviral effect is very limited due to the distinct mechanisms evolved by the virus to counteract PKR action.

In this work we have demonstrated the activation of GCN2 in response to HIV-1 RNA *in vitro* and in distinct cell lines transfected with a plasmid encoding HIV-1 cDNA clone competent for a single round of replication. Moreover, our results confirm that GCN2 activation negatively regulates HIV-1 mRNA translation, suggesting that this eIF2 α kinase could act as a viral sensor and be involved in the antiviral response against HIV-1.

We have also studied the role of HIV-1 protease in GCN2 proteolytic degradation, and we found that infection of human cells with HIV-1 conveys the proteolytic cleavage of GCN2. Our results also showed that HIV-1 purified protease produce direct proteolysis of GCN2 *in vitro*, abrogating the activation of GCN2 by HIV-1 RNA.

Finally, we have assayed *in vitro* eIF2 α kinase activity of GCN2 in the presence of HIV-1 Tat protein, and we have observed a reduction of eIF2 α phosphorylation. Moreover, we have confirmed that HIV-1 Tat protein inhibits GCN2 eIF2 α kinase activity by acting as a competitive inhibitor.

These results suggest that viral RNA produced during HIV-1 infection activates GCN2 leading inhibition of viral RNA translation, and that cleavage of GCN2 by HIV-1 protease and competitive inhibition by Tat could represent distinct mechanisms of HIV-1 to counteract GCN2 antiviral activity.

INTRODUCCIÓN

Una célula cualquiera necesita en cada instante miles de proteínas diferentes. Estas proteínas han de ser sintetizadas en respuesta a las necesidades celulares del momento, transportadas hasta la localización celular adecuada y degradadas cuando ya no son necesarias (*Nelson and Cox, 2006*). El control de la traducción en las células eucariotas es un proceso crítico en la regulación de la expresión génica durante situaciones de privación de nutrientes y estrés celular, el desarrollo y la diferenciación de la célula, la función del sistema nervioso, el envejecimiento y el origen de enfermedades. En comparación con la regulación transcripcional, el control de la traducción de los ARN mensajeros (ARNm) permite cambios más rápidos en la concentración celular de las proteínas codificadas en la célula. Este control favorece el mantenimiento de la homeostasis celular además de provocar cambios más permanentes en la fisiología de la célula (*Sonenberg and Hinnebusch, 2009*).

1. LA TRADUCCIÓN

La traducción es el proceso a través del cual la información genética contenida en los nucleótidos del ARNm se emplea para generar las secuencias de aminoácidos que constituyen las proteínas. La maquinaria responsable de la traducción del mensaje genético del ARNm se compone de tres elementos principales: el ARN transferente (ARNt), las aminoacil ARNt sintetasas y el ribosoma (*Watson et al., 2004*).

1.1. EL ARN MENSAJERO

El ARNm contiene la información que debe ser interpretada por la maquinaria de la traducción y se comporta como un molde o plantilla para que se lleve a cabo este proceso. La región codificante del ARNm consiste en una serie ordenada de tripletes de nucleótidos, denominados codones, que determinan el orden de los aminoácidos que constituirán las proteínas sintetizadas. Esta serie de codones contiguos constituye el marco abierto de lectura (*open reading frame*, ORF), que no se localiza en ninguno de los extremos del ARNm, sino internamente. De esta manera, la traducción de la información comienza en el extremo 5' del ORF y termina en su correspondiente extremo 3'. El primer codón traducido se conoce como codón de inicio (5'-AUG-3', en eucariotas), mientras que el último codón traducido recibe el nombre de codón de terminación (*Watson et al., 2004*).

La eficiencia de la traducción de los ARNm eucarióticos viene limitada por el tiempo empleado en constituir los complejos necesarios para iniciar el proceso de lectura, y esto se encuentra relacionado con las características estructurales del ARNm (*Pestova et al., 2007*). El ARNm de eucariotas posee una modificación química específica en el extremo 5' denominada cap, que está constituida por una guanina metilada unida al extremo del ARNm mediante un enlace 5'-5' compuesto por tres grupos fosfato ($m^7G[5']ppp[5']N$). A continuación de la estructura cap, y antes de la región codificante, se encuentra una región no codificante 5' (5' *untranslated region*, 5' UTR), que en algunos ARNm contiene un nucleótido de purina tres nucleótidos antes del codón de inicio, incrementando la eficiencia de la traducción. Existe otra región no codificante en el extremo 3', a continuación del codón de terminación, denominada 3' UTR. Junto a esta región 3' UTR se encuentra otro elemento estructural del ARNm que favorece el inicio de la traducción; se trata de una secuencia de nucleótidos de adenina repetidos llamada cola de poli(A), sintetizada por la enzima poli(A) polimerasa (*Watson et al., 2004*).

1.2. EL ARN TRANSFERENTE Y LAS AMINOACIL ARNt SINTETASAS

El ARN transferente es un adaptador entre los codones que llevan el mensaje genético y los aminoácidos que codifican. Hay muchos tipos de ARNt, pero cada uno está vinculado a un aminoácido específico y reconoce un concreto codón, o codones, en el ARNm (*Watson et al., 2004*).

Se dice que un ARNt está cargado cuando se encuentra unido al aminoácido correspondiente. Las enzimas aminoacil ARNt sintetasas son las proteínas encargadas de establecer un enlace entre el grupo carboxilo del aminoácido y el grupo hidroxilo 2' o 3' de la adenosina del extremo 3' del ARNt (*Watson et al., 2004*).

1.3. EL RIBOSOMA

El ribosoma es el elemento macromolecular que dirige la síntesis de proteínas. Se compone de dos complejos de ARN ribosómico (ARNr) y proteínas, conocidos como subunidad grande y subunidad pequeña. La subunidad grande contiene el centro peptidil transferasa (sitio P), que es responsable de la formación del enlace peptídico que se produce entre aminoácidos durante la síntesis de

proteínas. La subunidad pequeña contiene el centro de descodificación (sitio A), en el que los ARNt cargados identifican y descodifican los codones del ARNm (*Watson et al., 2004*).

Las subunidades grande y pequeña se nombran en función de la velocidad de sedimentación que presentan cuando se someten a centrifugación. La unidad de medida es el Svedberg (S), y el ribosoma de eucariotas se compone de una subunidad 60S (grande) y otra subunidad 40S (pequeña), que juntas dan lugar al ribosoma 80S. Existe un ciclo ribosomal en el que las subunidades del ribosoma se asocian entre sí y con el ARNm, se traduce el mensaje genético que éste contiene y, después, se vuelven a disociar para dar lugar de nuevo a otra ronda de traducción (*Watson et al., 2004*).

Aunque un ribosoma sólo puede sintetizar un único polipéptido en cada ronda de traducción, el ARNm puede ser traducido simultáneamente por varios ribosomas. Este complejo compuesto por un ARNm y varios ribosomas se conoce como polirribosoma o polisoma. Este hecho explica la relativamente limitada abundancia de los ARNm en la célula (1-5% del total de ARN) (*Watson et al., 2004*).

1.4. LAS ETAPAS DE LA TRADUCCIÓN

El proceso de traducción se puede dividir en tres etapas: iniciación, elongación y terminación (*Sonenberg and Hinnebusch, 2009*).

Durante la etapa de iniciación, el ribosoma se une al ARNm, el ARNt iniciador cargado se sitúa en el ribosoma y se produce un rastreo desde el extremo 5' del ARNm hasta identificar el codón de inicio 5'-AUG-3' (*Watson et al., 2004*). La regulación de la traducción se ejerce principalmente a lo largo de esta primera etapa (*Sonenberg and Hinnebusch, 2009*).

En la etapa de elongación, el aminoacil-ARNt correspondiente se sitúa en el sitio A de entrada en el ribosoma. Posteriormente, se forma el enlace peptídico entre el aminoácido de este ARNt y la cadena polipeptídica del peptidil-ARNt situado en el sitio P. Finalmente, se produce la translocación del peptidil-ARNt localizado en el sitio A hacia el sitio P del ribosoma para así comenzar de nuevo este proceso (*Watson et al., 2004*).

En la etapa de terminación, el codón de terminación del ARNm es reconocido por factores de liberación que impiden la unión de otros aminoacil-ARNt, activan la hidrólisis del polipéptido y el peptidil-ARNt, y provocan la liberación de éste del ribosoma (*Watson et al., 2004*).

2. LA ETAPA DE INICIACIÓN DE LA TRADUCCIÓN

La iniciación de la traducción consiste en una serie de procesos, en cada uno de los cuales intervienen varios factores eucarióticos de inicio o eIFs (**Tabla 1**). Existen al menos doce factores de inicio bien caracterizados que comprenden treinta o más polipéptidos y que desarrollan una serie de funciones que no han sido caracterizadas de manera completa. Suelen agruparse según la etapa en la que intervienen primero, aunque muchos de ellos desempeñan varias funciones y en diferentes etapas (*Pestova et al., 2007*).

En la iniciación de la traducción se pueden distinguir varios procesos: el ensamblaje del complejo de preiniciación 43S; la activación del ARNm y el reclutamiento del complejo 43S; y el rastreo del ARNm y reconocimiento del codón de iniciación AUG (**Figura 1**).

2.1. FORMACIÓN DEL COMPLEJO DE PREINICIACIÓN 43S

En esta fase se produce el ensamblaje de un complejo ribonucleoproteico llamado complejo de preiniciación 43S (PIC). Está constituido en parte por el metionil ARNt iniciador (Met-ARNt_i), que forma el denominado complejo ternario (TC) junto con el factor de inicio eIF2 y GTP. Este ensamblaje es estimulado por los factores de inicio 1, 1A y 5, y el complejo eIF3, que se unen directamente (excepto eIF5) a la subunidad 40S ribosomal (*Hinnebusch, 2011*). En levaduras, un conjunto de interacciones provoca la unión de los factores 1, 3 y 5, y el complejo ternario en un complejo multifactor (MFC) (*Asano et al., 2000*) que favorece la formación y la estabilidad del complejo de preiniciación 43S (*Hinnebusch et al., 2007*).

2.2. ACTIVACIÓN DEL ARNm Y RECLUTAMIENTO DEL COMPLEJO 43S

El complejo de preiniciación 43S se une al ARNm a través de la estructura cap situada en el extremo 5' y del complejo eIF4F, compuesto por la proteína de unión al grupo cap eIF4E, eIF4G y la helicasa de ARN eIF4A. Por otro lado, también

se produce la unión del ARNm al complejo eIF4F a través de la proteína de unión a la cola de poli(A) (PABP) (*Hinnebusch, 2011*).

Nombre	Función
eIF2	- Formación del complejo ternario eIF2·GTP·Met-ARNt iniciador, que se une a la subunidad 40S
eIF3	- Unión a la subunidad 40S, a eIF1, a eIF4G y a eIF5 - Estimulación de la unión del complejo ternario a la subunidad 40S - Promueve la unión del complejo 43S al ARNm y el rastreo posterior - Disociación de los ribosomas y actividad anti-asociación de las subunidades ribosomales
eIF1	- Asegura la fidelidad de la selección del codón de inicio - Promueve el rastreo ribosomal - Estimulación de la unión del complejo ternario a la subunidad 40S - Previene la hidrólisis prematura dependiente de eIF5 del complejo eIF2·GTP
eIF1A	- Estimulación de la unión del complejo ternario a la subunidad 40S - Cooperación con eIF1 en favorecer el rastreo ribosomal y la selección del codón de inicio
eIF4E	- Unión a la estructura cap m ⁷ GpppG5' terminal del ARNm
eIF4A	- DEAD-box ATPasa y ARN helicasa dependiente de ATP
eIF4G	- Unión a eIF4E, a eIF4A, a eIF3, a PABP y al ARN mensajero - Incrementa la actividad helicasa de eIF4A
eIF4F	- Complejo de unión a la estructura cap, constituido por eIF4E, eIF4A y eIF4G - Desenrolla el extremo 5' del ARNm - Favorece la unión del complejo 43S al ARNm - Ayuda a los complejos ribosomales durante el rastreo
eIF4B	- Proteína de unión a ARN que incrementa la actividad helicasa de eIF4A
eIF4H	- Proteína de unión a ARN que incrementa la actividad helicasa de eIF4A (homólogo de un fragmento de eIF4B)
eIF5	- Proteína activadora de la función GTPasa, específica de eIF2·GTP, que induce la hidrólisis de este complejo durante el reconocimiento del codón de inicio
eIF5B	- GTPasa dependiente de ribosoma que interviene en la unión de las subunidades ribosomales
eIF2B	- Factor de intercambio de nucleótidos de guanina que promueve el intercambio GDP/GTP de eIF2
DHX29	- Proteína que contiene un grupo DExH-box que se une a la subunidad 40S y que promueve el rastreo de ARNm con región 5'UTR larga y muy estructurada
eIF6	- Factor que evita la asociación de las subunidades ribosomales
PABP	- Unión a la cola de poli(A) del ARNm y a eIF4G - Incrementa la unión de eIF4F a la estructura cap

TABLA 1: Factores eucarióticos de inicio de la traducción (*Jackson et al., 2010*).

La función del complejo eIF4F es facilitar la unión del complejo 43S al ARNm a través de la interacción cap·eIF4E·eIF4G·eIF3 para formar el complejo 48S (*Prevot et al., 2003*). eIF4G es una proteína andamio que posee dominios para la unión con varios eIFs; estos dominios, y su capacidad de unirse a ARN (*Berset et al., 2003*;

Park et al., 2011; Yanagiya et al., 2009), permiten a eIF4G constituir un complejo ribonucleoproteico estable con forma circular cerrada (*Hinnebusch, 2011*).

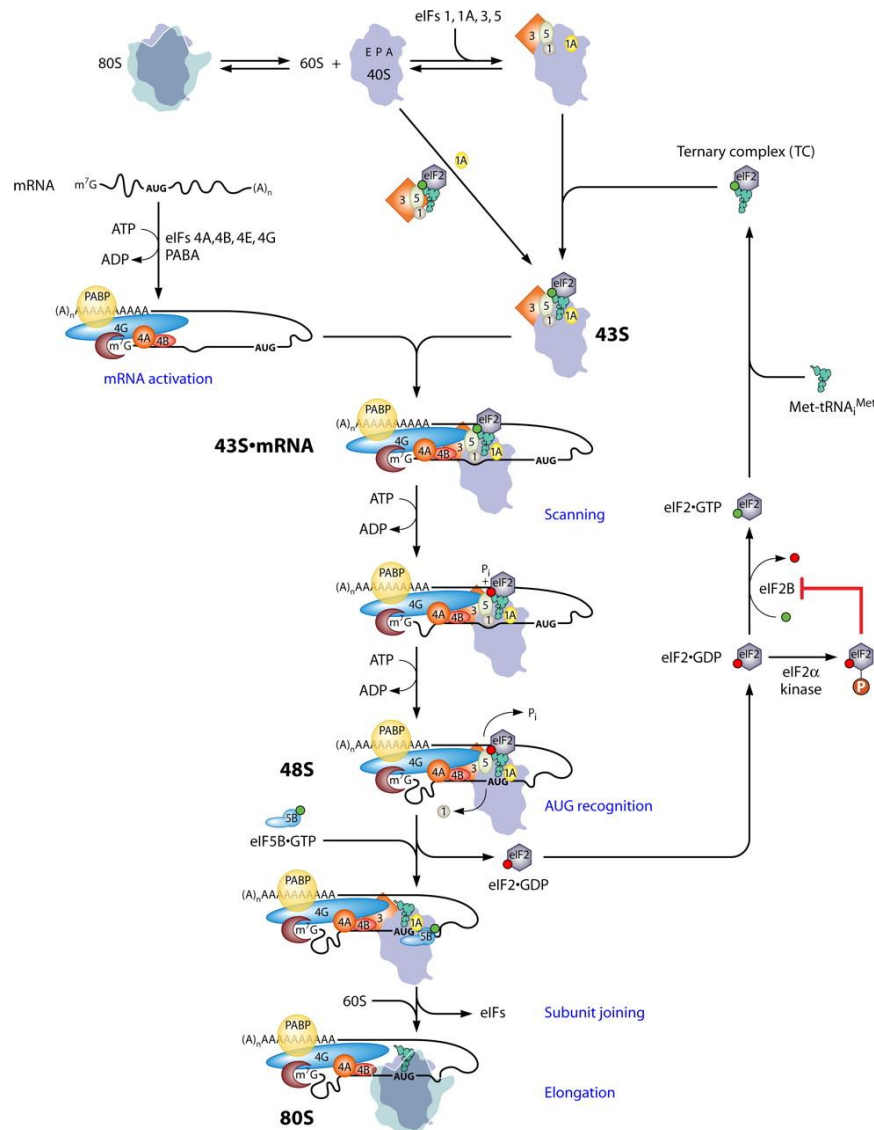


FIGURA 1: Iniciación de la traducción cap dependiente en células eucariotas. La iniciación de la traducción comienza con la disociación de los ribosomas en las subunidades 40S y 60S, la formación del complejo de preiniciación 43S, y su unión a la subunidad ribosomal 40S. El complejo 43S está constituido por varios factores de inicio y por el complejo ternario eIF2·GTP·Met-ARN_i. Por otro lado, el ARNm es activado mediante la unión de eIF4F y PABP a la estructura cap y a la cola de poli(A) del ARNm, respectivamente. El ARNm activado se une al complejo 43S, dando lugar al complejo 48S, y se produce el rastreo del ARNm a partir de su extremo 5', el reconocimiento del codón AUG de inicio, y la hidrólisis de GTP del complejo ternario. La iniciación de la traducción finaliza con la liberación de eIF2·GDP y de otros factores de inicio, la unión de las subunidades ribosomales grande y pequeña para dar lugar al complejo 80S, y la entrada en la fase de elongación (*Modificado de Hinnebusch et al., 2007*).

2.3. RASTREO DEL ARNm Y RECONOCIMIENTO DEL CODÓN DE INICIO

Una vez unido a la estructura cap, el complejo 43S rastrea el ARNm hasta llegar a un codón AUG de inicio situado en un contexto de secuencia adecuado. Este reconocimiento se basa en la complementariedad del anticodón del ARN_t_i y el codón de inicio (*Hinnebusch, 2011*).

El reconocimiento del codón AUG provoca la parada del rastreo del ARNm y la hidrólisis del GTP unido al factor de inicio eIF2 del complejo ternario; esta hidrólisis es dependiente del factor eIF5, que se trata de una proteína activadora de la función GTPasa (GAP). Todos estos sucesos causan la formación de un complejo de preiniciación 48S estable (*Hinnebusch, 2011*).

Finalmente, se produce la liberación del complejo eIF2·GDP y otros factores de inicio presentes en el complejo de preiniciación. La subunidad 60S se une a la subunidad 40S, proceso catalizado por el factor eIF5B, y se da lugar al complejo de iniciación 80S. Este complejo contiene el Met-ARN_t_i apareado con el codón AUG en el sitio P, preparado para comenzar la fase de elongación de la síntesis de proteínas (*Hinnebusch, 2011; Pestova et al., 2007*).

3. REGULACIÓN DE LA TRADUCCIÓN

3.1. IMPORTANCIA DEL CONTROL TRADUCCIONAL

Analizando el proceso de expresión génica en su totalidad, la traducción se encuentra en la mitad de una ruta que comienza con la transcripción, continúa con el procesamiento y transporte del ARN, y finaliza con la síntesis, translocación, modificación, plegamiento y degradación de las proteínas. Aunque cada una de estas etapas se encuentra regulada, la transcripción y la traducción son procesos especialmente críticos para la célula, ya que ambas son fases biosintéticas en las que la célula emplea grandes cantidades de energía (*Mathews et al., 2007*).

La transcripción tiene numerosos puntos de regulación, pero el control traduccional ofrece ciertas ventajas que lo justifican, como son la rapidez, la reversibilidad, principalmente a través de procesos de fosforilación/desfosforilación, la generación de gradientes de proteínas en la célula o control espacial, y la

capacidad de regulación en células que carecen de control transcripcional, como los reticulocitos (*Mathews et al., 2007*).

3.2. DIANAS Y MECANISMOS DEL CONTROL TRADUCCIONAL

Los niveles celulares de proteínas no suelen corresponder con sus correspondientes niveles de ARNm. En muchos casos, la eficiencia innata y la regulación temporal de la traducción del ARNm contribuyen de manera importante a establecer la cantidad de proteínas en la célula (*Mathews et al., 2007*).

Las células responden rápidamente a los estímulos externos modificando la tasa global de síntesis de proteínas y/o la eficiencia traduccional de los ARNm específicos. Como la iniciación de la traducción es generalmente la fase limitante, la mayor parte de los procesos de control de la traducción se producen durante esta etapa. Esta regulación se realiza a través de mecanismos basados en las características del ARNm y de la maquinaria traduccional, y además intervienen proteínas que actúan en *trans* y factores asociados a ARNm (*Mathews et al., 2007*).

3.2.1. Regulación traduccional a través de la modificación de los factores de inicio

La fosforilación de algunos factores de inicio de la traducción es el principal método de regulación del proceso de unión del ARNm a la maquinaria traduccional. Varios factores que facilitan esta unión del ARNm a los ribosomas (eIF4E, eIF4G, eIF4B y eIF3) son fosforilados, y su estado de fosforilación está relacionado directamente con la traducción y el crecimiento celular, pero cómo afecta a sus actividades es algo todavía desconocido (*Mathews et al., 2007*). La fosforilación de estos factores está condicionada por varias situaciones tales como estrés celular, apoptosis, infección viral, y respuesta a factores de crecimiento y hormonas.

La regulación de la actividad del factor eIF4E, implicado en el reconocimiento y la unión del ARNm, es especialmente importante en la regulación de la traducción. Es llevada a cabo por proteínas de la familia 4E-BP, que se unen a eIF4E cuando se encuentran hipofosforiladas, evitando la unión del factor con eIF4G. La fosforilación de las proteínas 4E-BP reduce su afinidad por eIF4E y revierte la inhibición (*Mathews et al., 2007*).

Un segundo punto clave de regulación de la traducción es la unión del Met-ARN_t al ARNm, que puede regularse a través de la fosforilación del factor eIF2. Al contrario de lo que sucede con el complejo eIF4F, la fosforilación de eIF2 inhibe la síntesis de proteínas. Esta fosforilación posee un papel dominante en la inhibición de

la síntesis de proteínas que se produce en la células en respuesta a situaciones de estrés tales como choque térmico, hipoxia, privación de aminoácidos y nutrientes, e infección viral (*Mathews et al., 2007*).

3.3. REGULACIÓN DE LA TRADUCCIÓN A TRAVÉS DE LA FOSFORILACIÓN DEL FACTOR eIF2

Un evento necesario y crítico para el inicio de la traducción es la unión de la subunidad ribosomal 40S libre con el complejo ternario, constituido por el factor eIF2, GTP y el Met-ARN_t (*Hinnebusch et al., 2007*).

3.3.1. Estructura del factor eIF2

El factor eIF2 consta de tres subunidades: alfa (α), beta (β) y gamma (γ) (*Kimball, 1999; Proud, 2005*).

La subunidad α posee tres dominios diferentes: un dominio amino terminal que no tiene actividad específica de unión a ARN (*Yatime et al., 2004*) y que interacciona con la región central de la subunidad; un dominio central compuesto por α -hélices; y un dominio carboxilo terminal que interacciona con la subunidad γ y que favorece la unión al Met-ARN_t (*Yatime et al., 2006; Yatime et al., 2004*). El dominio amino terminal contiene un lugar de fosforilación en el residuo serina 51 (Ser-51) que está implicado en la regulación de la traducción. Este dominio de regulación se encuentra altamente conservado entre diferentes especies de organismos eucariotas (*Hinnebusch et al., 2007*).

La subunidad β se compone de tres regiones y su función no se conoce exactamente. La región amino terminal contiene tres zonas de residuos de lisina repetidos, participa en la unión a ARN e interacciona con los factores eIF5 y eIF2B (*Asano et al., 1999; Das and Maitra, 2000; Laurino et al., 1999*). La región central interacciona con la subunidad γ , mientras que la región carboxilo terminal contiene un motivo de dedo de zinc que es necesario para que se realice la actividad de unión a ARNm de esta subunidad (*Cho and Hoffman, 2002; Gutierrez et al., 2004; Thompson et al., 2000*).

La subunidad γ es un polipéptido que posee lugares de unión a GTP y al Met-ARN_t. Es homóloga al factor de elongación de la traducción EF-Tu/eEF1A, una GTPasa que une ARN_t aminoacilados y que los libera al ribosoma (*Pestova et al., 2007*). Cambios estructurales en la región de unión al Met-ARN_t de la subunidad γ , provocados por la hidrólisis de GTP y la liberación de fosfato inorgánico, explican la

disminución de la afinidad por el Met-ARN_t (*Yatime et al., 2006*). Además, las interacciones del factor eIF2 con la metionina del Met-ARN_t se rompen cuando el GTP es sustituido por GDP. Todos estos datos apoyan la idea de que se producen cambios conformacionales en el lugar de unión situado en el extremo 3' del ARN_t tras la hidrólisis de GTP, provocando la liberación del Met-ARN_t del complejo formado con el factor eIF2 (*Kapp and Lorsch, 2004*). Tanto la subunidad α como la subunidad β se unen a la subunidad γ , aunque no parece que ambas interactúen entre sí (*Schmitt et al., 2002*).

3.3.2. Función del factor eIF2

El factor eIF2 interviene en la unión del Met-ARN_t al ribosoma durante la iniciación de la traducción. Cuando el Met-ARN_t reconoce y se une al codón de inicio AUG, se produce la hidrólisis del GTP unido al factor eIF2. A continuación, se produce la liberación de eIF2·GDP y los demás factores de inicio. El complejo eIF2·GDP debe ser reactivado en forma de eIF2·GTP para comenzar una nueva ronda de iniciación, y para ello interviene el factor intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF) eIF2B (*Hinnebusch et al., 2007*). Esta reacción es inhibida en situaciones de estrés celular mediante la fosforilación del residuo Ser-51 de la subunidad α del factor eIF2 (eIF2 α -P) (*Hinnebusch et al., 2007*) (**Figura 2**).

El factor eIF2B es una proteína multimérica constituida por cinco subunidades (α , β , γ , δ y ϵ) (*Proud, 2005*). Las subunidades α , β y δ poseen secuencias similares y forman un subcomplejo regulador que hace susceptible a eIF2B de ser inhibido por eIF2 fosforilado (*Krishnamoorthy et al., 2001; Pavitt et al., 1997*); la subunidad γ se une a GTP y al Met-ARN_t (*Proud, 2005*); y la subunidad ϵ , la más grande del complejo proteico, contiene un dominio catalítico (*Gomez et al., 2002*) que interacciona con el factor eIF2 (*Asano et al., 1999*), y además forma un subcomplejo catalítico binario con la subunidad γ (*Pavitt et al., 1997*).

3.3.3. Regulación de la traducción a través de la fosforilación de eIF2 α

3.3.3.1. Inhibición de eIF2B

Uno de los principales mecanismos de control de la traducción en respuesta a diferentes tipos de estrés celular se produce en la etapa de iniciación, y viene dado por la fosforilación de la Ser-51 de eIF2 α (*de Haro et al., 1996*).

eIF2-P puede formar el complejo ternario e intervenir en el ensamblaje del complejo de preiniciación de manera eficiente, pero es un mal sustrato para el factor eIF2B (Hinnebusch *et al.*, 2007). eIF2-P incrementa su afinidad por eIF2B (Pavitt *et al.*, 1998; Proud, 1992), de manera que eIF2-P·GDP actúa como un inhibidor competitivo (Dever *et al.*, 1995; Rowlands *et al.*, 1988), se impide la unión al complejo sin fosforilar eIF2·GDP, y se bloquea el intercambio GDP/GTP. En la mayoría de las células, eIF2B es el factor limitante cuando se compara con la cantidad de eIF2; por ello, la fosforilación de un pequeño porcentaje de eIF2 supone el secuestro de la mayor parte del factor eIF2B, la formación de complejos eIF2-P·eIF2B inactivos y la inhibición de la síntesis de proteínas por ausencia de complejos ternarios eIF2·GTP·Met-ARN_t (Dever *et al.*, 2007).

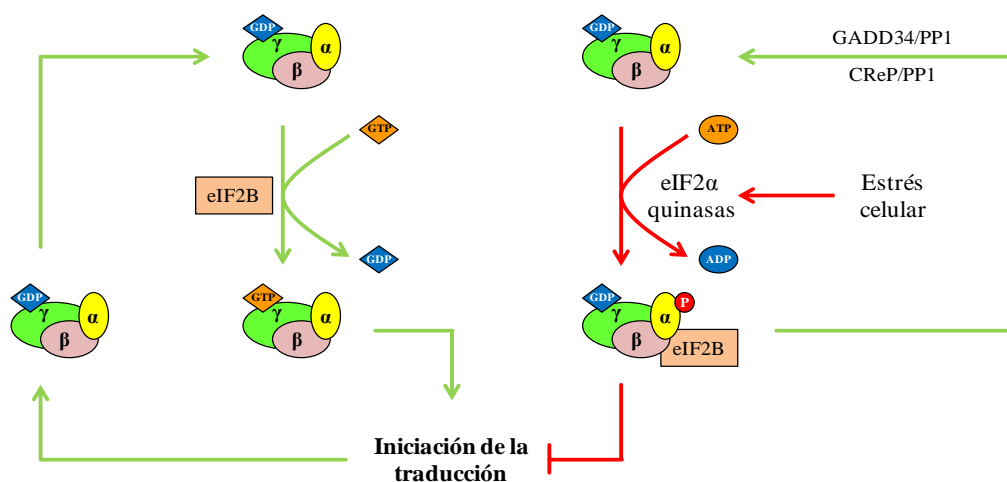


FIGURA 2: Mecanismo de regulación de la traducción por el factor eIF2. Al final de la iniciación de la traducción se produce la hidrólisis de GTP del complejo ternario eIF2·GTP·Met-ARN_t y la liberación de eIF2·GDP. El factor eIF2B reactiva este complejo binario en forma de eIF2·GTP para poder comenzar una nueva ronda de iniciación de la traducción. En situaciones de estrés celular, las eIF2α quinasas se activan y fosforilan a eIF2 en su subunidad α, y este complejo fosforilado posee una mayor afinidad por el factor eIF2B que la forma no fosforilada. A pesar de ello, eIF2-P·GDP no es un buen sustrato del factor eIF2B, no puede ser reactivado y se impide el comienzo de una nueva ronda de iniciación de la traducción. Esta situación se revierte por la acción de la fosfatasa PP1 activada por subunidades reguladoras específicas (GADD34, CREP).

En eucariotas superiores, la fosforilación de eIF2α es un proceso muy regulado y se encuentra controlado por cuatro quinasas (eIF2α quinasas) que se activan en respuesta a diversas formas de estrés celular, y por dos complejos de fosfatasas que desfosforilan a eIF2α-P (Ron and Walter, 2007). Uno de los complejos se compone de una subunidad reguladora, CREP, y de una subunidad catalítica,

PP1c; el otro complejo está constituido por una subunidad reguladora, GADD34, y una subunidad catalítica, PP1c. Se cree que las subunidades reguladoras son las causantes de la especificidad de los complejos por el eIF2 α (*Gkogkas et al., 2010*).

3.3.3.2. Activación de la traducción de ARNm implicados en respuesta a estrés celular

La fosforilación de eIF2 α en respuesta a determinadas situaciones de estrés provoca la inhibición generalizada de la síntesis de proteínas por ausencia de complejos ternarios eIF2·GTP·Met-ARN_t. Sin embargo, al mismo tiempo se produce la activación de la traducción de ciertos ARNm implicados en la respuesta a estrés celular. Es el caso de los ARNm de los factores de transcripción GCN4, en levaduras, y de ATF4 y ATF5, en metazoos (*Dever et al., 1992; Harding et al., 2000; Jackson et al., 2010*). Estos ARNm tienen al menos dos ORF anteriores al codón AUG iniciador (uORF) que, en condiciones normales, mantienen inhibida su traducción (*Gkogkas et al., 2010; Jackson et al., 2010*).

En el caso de ATF4, la activación de la traducción del ARNm se encuentra regulada por la presencia de dos uORF. Según este modelo, los ribosomas rastrean el ARNm a partir del uORF1 y, posteriormente, se disocian. En condiciones normales, la subunidad ribosomal 40S vuelve a unirse a complejos ternarios para reiniciar la lectura a partir del uORF2, y esto impide la traducción a partir del codón AUG de ATF4 (**Figura 3**). En determinadas situaciones de estrés, como por ejemplo privación de nutrientes, la limitada cantidad de complejos ternarios evita que se pueda reiniciar el proceso a partir del uORF2 de ATF4, permitiéndose la traducción del ARNm de ATF4 (*Hinnebusch, 2005*).

La traducción de estos ARNm activa un programa de expresión génica cuyas dianas permiten que la célula se adapte a la situación de estrés que provocó la fosforilación de eIF2 α y la inhibición generalizada de la traducción. En el caso de GCN4, se provoca la activación transcripcional de genes implicados en la biosíntesis de aminoácidos; mientras que ATF4 activa la transcripción de genes que codifican proteínas implicadas en respuesta a estrés, como el factor de transcripción CHOP y la subunidad reguladora de la fosfatasa de eIF2 α (GADD34) (*Harding et al., 2000; Ron and Harding, 2007*).

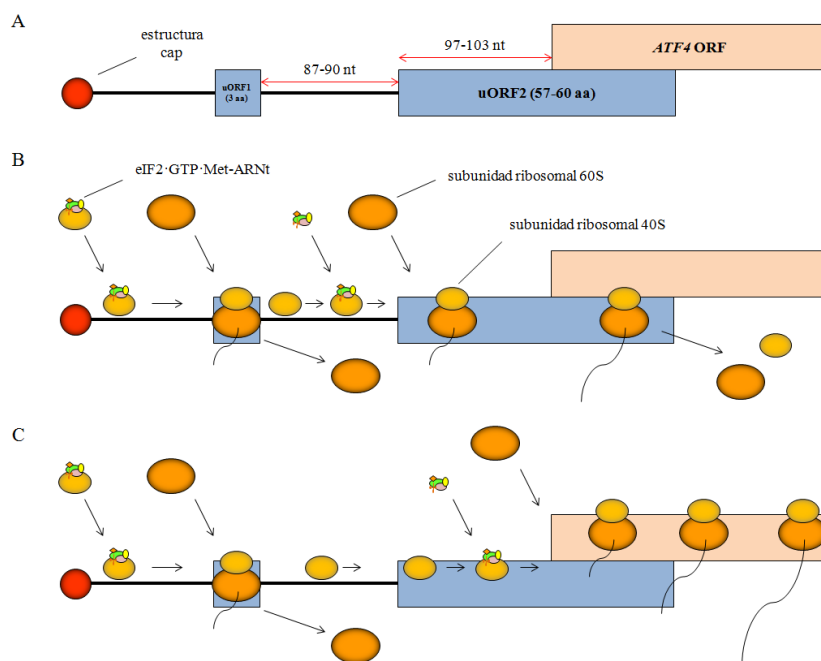


FIGURA 3: Mecanismo de regulación de la traducción del ARNm de ATF4. (A) Esquema del extremo 5' del ARNm de ATF4 de humano, indicando la localización de sus dos uORF. (B) Representación esquemática de la regulación de la traducción del ARNm de ATF4 en condiciones normales, sin estrés, cuando la cantidad de eIF2-GTP-Met-ARNt_i es abundante. Al finalizar la traducción del uORF1, las unidades ribosomales se separan, la subunidad menor vuelve a escanear el ARNm y, como la cantidad de complejo ternario es abundante, se constituye a tiempo el complejo 43S para reconocer el codón de inicio del uORF2, evitando que se inicie la traducción a partir del codón AUG de ATF4. (C) En situaciones de estrés, cuando la disponibilidad de eIF2-GTP-Met-ARNt_i es muy limitada, no se forma el complejo 43S a tiempo para reconocer el codón AUG del uORF2, permitiendo la traducción del ARNm de ATF4 (Jackson *et al.*, 2010).

3.4. *eIF2α* QUINASAS

Las eIF2α quinasas regulan la síntesis de proteínas en células eucariotas mediante la fosforilación de eIF2α en respuesta a diferentes tipos de estrés (de Haro *et al.*, 1996). Se han identificado cuatro eIF2α quinasas en células de mamífero: HRI (*heme regulated inhibitor*) o inhibidor regulado por hemina; PKR (*protein kinase R/RNA-dependent protein kinase*) o proteína quinasa regulada por ARN de doble banda; PERK (*PKR-like endoplasmic reticulum kinase*) o proteína quinasa regulada por estrés en el retículo endoplásmico; y GCN2 (*general control non-derepressible-2*) o proteína quinasa regulada por limitación de nutrientes (de Haro *et al.*, 1996; Dever *et al.*, 2007). Algunas de estas quinasas se encuentran también en otros organismos, como es el caso de GCN2 y PERK en *Drosophila melanogaster* (Pomar *et al.*, 2003; Santoyo *et al.*, 1997), GCN2 en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*

(Hinnebusch, 1997), y Gcn2 y dos eIF2 α quinasas relacionadas con HRI (Hri1 y Hri2) en la levadura *Schizosaccharomyces pombe* (Zhan *et al.*, 2002) (**Figura 4**).

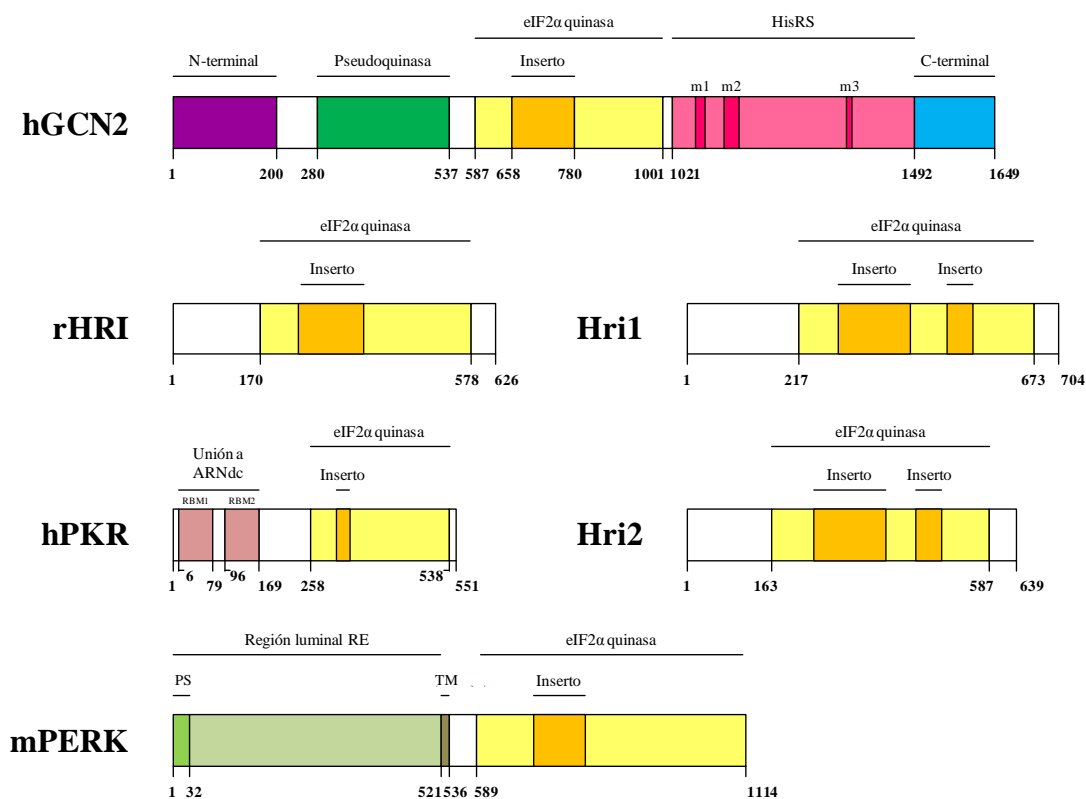


FIGURA 4: Estructura de las eIF2 α quinasas. GCN2 de humano, HRI de rata, PKR de humano, PERK de ratón, y Hri1 y Hri2 de *Schizosaccharomyces pombe*. Las eIF2 α quinasas presentan un dominio catalítico común con actividad quinasa, con uno o dos insertos de tamaño variable. Cada una de ellas presenta diferentes dominios reguladores que les confieren la capacidad de responder a distintas situaciones de estrés. PS: péptido señal. TM: dominio transmembrana.

Las eIF2 α quinasas comparten un dominio catalítico, dominio quinasa, con doce subdominios muy conservados característicos de todas las Ser/Thr quinasas de eucariotas (Hanks and Hunter, 1995), y existe aproximadamente un 25-37% de homología en la secuencia de aminoácidos de este dominio entre las cuatro eIF2 α quinasas (Dever *et al.*, 2007). Además, el dominio quinasa presenta en todas ellas un inserto situado entre los dominios IV y V, de longitud entre 30 y 200 aminoácidos (Hanks and Hunter, 1995; Samuel, 1993), que varía entre las diferentes eIF2 α quinasas (Berlanga *et al.*, 1999). Este inserto diferencia a las eIF2 α quinasas de otras Ser-Thr quinasas.

Por otro lado, la capacidad de las eIF2 α quinasas de responder a diferentes estímulos viene determinada por la presencia de dominios reguladores, diferentes entre cada una de las quinasas (*Dever et al., 2007*).

Un requisito para que se produzca la activación de las eIF2 α quinasas es su dimerización. PKR y PERK son monómeros en su estado latente, y su activación está relacionada con la dimerización y oligomerización, respectivamente, de sus dominios reguladores. GCN2 es un dímero constitutivo, y HRI sufre un proceso de maduración y dimeriza para poder ser regulada por la presencia de hemina (*Dever et al., 2007*).

3.4.1. Inhibidor regulado por hemina (HRI)

HRI es una proteína de aproximadamente 70 kDa (*de Haro et al., 1996*) y la principal eIF2 α quinasa en células eritroides, en las cuales se activa en situaciones de privación de hemina (*Lu et al., 2001*). Se piensa que la función de HRI en estas células es coordinar la síntesis de globina en función de la disponibilidad de hierro, bloqueando la síntesis de proteínas cuando el grupo hemo es escaso (*Dever et al., 2007*). HRI se encuentra en otros tipos celulares (*Berlanga et al., 1998*) y responde también a otras situaciones de estrés como exposición a cadmio, arsenito y óxido nítrico, choque térmico y estrés osmótico (*Lu et al., 2001; McEwen et al., 2005*).

La forma inmadura de HRI es incapaz de responder a cambios en la cantidad disponible de hemina, pero tras procesos posteriores de maduración en los que están implicadas varias proteínas chaperonas, como la proteína Hsp90, la quinasa es inhibida por el grupo hemo (*Dever et al., 2007*). Se han identificado dos lugares de unión a hemina en la secuencia de HRI (*Rafie-Kolpin et al., 2000*). El primero está localizado en la región amino terminal, inmediatamente antes del dominio quinasa, y se une a grupos hemo de manera constitutiva; mientras que el segundo se encuentra en el inserto, y su unión reversible a hemina está relacionada con la regulación de la actividad de HRI (*Dever et al., 2007*).

La forma madura de HRI es un homodímero, y la inhibición de la actividad de la quinasa por hemina se ha relacionado con la formación de puentes disulfuro intermoleculares entre los dos monómeros (*Yang et al., 1992*).

3.4.2. Proteína quinasa regulada por estrés en el retículo endoplásmico (PERK)

PERK es una proteína transmembrana de aproximadamente 1100 aminoácidos localizada en el retículo endoplásmico y que responde a determinadas situaciones de estrés en este orgánulo. Se pueden distinguir varios dominios en su secuencia: una región amino terminal con actividad reguladora, situada en el lumen del retículo endoplásmico; un dominio transmembrana; y una región carboxilo terminal, que contiene el dominio quinasa, localizada en el citoplasma (*Dever et al., 2007*).

En células no estresadas, PERK interacciona con dos proteínas chaperonas del retículo endoplásmico, BiP (GRP78) y GRP94, a través de su dominio amino terminal (*Bertolotti et al., 2000; Ma et al., 2002*). Cuando se produce la acumulación de proteínas mal plegadas en situación de estrés en el retículo endoplásmico, se disocian las chaperonas de PERK, permitiendo que la quinasa dimerice a través del dominio amino terminal y se active, fosforilando a eIF2 α en el citoplasma (*Bertolotti et al., 2000*).

3.4.3. Proteína quinasa regulada por ARN de doble banda (PKR)

PKR se trata de una proteína de aproximadamente 68 kDa que se encuentra presente en todos los vertebrados y cuya expresión es inducida por interferón (IFN). En células humanas, se distinguen en su secuencia dos motivos de unión a ARN de doble banda (dsRBM), localizados entre los residuos 6-79 y 96-169, justo antes del dominio quinasa (residuos 258-538). El motivo dsRBM2 mantiene inactiva a PKR mediante interacciones con el dominio quinasa, pero la presencia de ARN de doble banda (ARNdc) libera esta inhibición (*Dever et al., 2007*).

La unión de ARNdc a los motivos dsRBM provoca la dimerización de PKR, que a su vez causa la activación de la quinasa. Esta unión es independiente de la secuencia de ARN, pero el ARNdc debe ser al menos de 16 pares de bases (*Schmedt et al., 1995*), mientras que para que se produzca la activación de PKR, es necesaria una longitud mínima de 40 pares de bases (*Manche et al., 1992; Zheng and Bevilacqua, 2004*). Los motivos dsRBM también pueden unirse a estructuras secundarias complejas de ARN como son los bucles y los pseudonudos (*pseudoknots*) (*Dever et al., 2007*).

Por otro lado, la concentración de ARNdc es otro factor decisivo en la activación de PKR; mientras que bajas concentraciones de ARNdc sí causan la activación de la quinasa, concentraciones elevadas la inhiben (*Hunter et al., 1975*). Este hecho se debe a la unión de dos monómeros de PKR con dos moléculas diferentes de ARN, impidiéndose la dimerización de la quinasa (*Dever et al., 2007*), que habitualmente se produce por la interacción de una molécula de ARNdc con dos moléculas de PKR.

La infección viral es detectada por las células a través del reconocimiento de moléculas específicas de los virus, incluyendo ARNdc y ARN monocatenario (ARNmc), a través de proteínas transmembrana de la familia de los receptores *toll-like* (TLR) y de proteínas citoplásmicas, como RIG, MDA5 y PKR (*Yoneyama et al., 2005; Yoneyama et al., 2004*). Esto convierte a PKR en un elemento clave de la inmunidad innata en respuesta a infecciones virales (*Ron and Harding, 2007*).

3.4.4. Proteína quinasa regulada por limitación de nutrientes (GCN2)

GCN2 es la única eIF2 α quinasa que se encuentra en todas los organismos eucariotas. Fue descrita por primera vez en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, en la cual interviene en la respuesta a la privación de aminoácidos mediante su activación por la unión a ARNt no cargados (*Wek et al., 1995*).

La estructura de GCN2 es compleja y contiene varios dominios: el dominio amino terminal, que se une al complejo GCN1/GCN20, necesario para su activación en *Saccharomyces cerevisiae* (*Garcia-Barrio et al., 2000*); el dominio pseudoquinasa, de función desconocida; el dominio eIF2 α quinasa; el dominio histidil-ARNt sintetasa (HisRS), que interviene en la unión a ARN; y el dominio carboxilo terminal, implicado en la dimerización de la quinasa, en favorecer la unión a ARN, y en la unión directa a ribosomas (*Dever et al., 2007*). La unión eficiente a ARNt requiere tanto del dominio HisRS como del dominio carboxilo terminal (*Dong et al., 2000*), y es dependiente del motivo m2 del dominio HisRS. Este motivo es un elemento conservado en las ARNt sintetasas de clase II y necesario para la unión a ARNt (*Dong et al., 2000; Wek et al., 1995*).

GCN2 dimeriza mediante interacciones entre el dominio carboxilo terminal, el dominio HisRS y el dominio quinasa de dos monómeros (*Qiu et al., 1998*). Además, el dominio carboxilo terminal interacciona con el dominio HisRS y el

dominio quinasa, y el dominio HisRS y el dominio quinasa también interaccionan entre sí (*Qiu et al., 2001*), manteniendo a GCN2 en un estado inactivo en condiciones normales. Cuando se produce una situación de privación de aminoácidos, se acumulan los ARNt no cargados y se unen al dominio HisRS, desapareciendo el efecto autoinhibitorio provocado por la unión entre dominios y causando la activación de la quinasa (*Dever et al., 2007*).

GCN2 también puede activarse en levaduras en respuesta a limitación de nucleótidos de purina, estrés hiperosmótico, limitación de glucosa, y exposición a rapamicina o metilmetano sulfonato (MMS); mientras que en células de mamífero se activa en respuesta a luz ultravioleta (UV) (*Deng et al., 2002; Hinnebusch, 2005*) y a ARN viral (*Berlanga et al., 2006*).

3.4.5. Proteínas quinasas de *Schizosaccharomyces pombe*: Hri1 y Hri2

En la levadura *Schizosaccharomyces pombe* se han descrito tres eIF2 α quinasas, el homólogo de GCN2 de *Saccharomyces cerevisiae*, y dos eIF2 α quinasas relacionadas con HRI de mamífero: Hri1 y Hri2. Hri1 tiene un peso molecular de 85 kDa, mientras que en el caso de Hri2 es de 75 kDa (*Zhan et al., 2002*). Ambas proteínas presentan una homología entre sí del 45,8%, mientras que si se comparan con la eIF2 α quinasa HRI de mamífero, la homología es del 40,7% y del 43%, respectivamente. Una característica que presentan ambas quinasas, que no comparten con ninguna otra eIF2 α quinasa, es la presencia de un segundo inserto entre los subdominios VIb y VII del dominio quinasa; en el caso de Hri1, consta de 33 aminoácidos, mientras que el de Hri2 es de 22 aminoácidos (*Herrero, 2000*).

Hri2 interviene en la respuesta a diferentes situaciones de estrés, como la presencia de arsenito, arsenato o agentes genotóxicos en el medio de cultivo, choque térmico y estrés oxidativo (*Berlanga et al., 2010; Zhan et al., 2004; Zhan et al., 2002*). Por otro lado, Hri1 interviene en la respuesta a la ausencia de nutrientes en el medio de cultivo y se activa a medida que el cultivo entra en fase estacionaria, fundamentalmente como consecuencia de la ausencia de nitrógeno (*Martín, 2012*).

3.5. CONTROL DE LA TRADUCCIÓN DURANTE LA INFECCIÓN VIRAL

Los virus son parásitos intracelulares obligados que dependen de las células que infectan para poder realizar su ciclo de replicación. Esta relación de dependencia

se ve de manera muy clara en el proceso de traducción, ya que los virus carecen de la maquinaria traduccional necesaria (*Mohr et al., 2007*).

El material genético de los virus puede ser ADN o ARN, de cadena simple o de doble cadena. Si se trata de moléculas de ARN monocatenario, puede ser de sentido positivo (equivalente al ARNm), de manera que puede ser empleado directamente por la maquinaria traduccional de la célula huésped, o negativo (equivalente al complementario del ARNm), que debe convertirse en ARN positivo por una ARN polimerasa antes de la traducción. Del mismo modo, las estrategias virales para replicar su material genético son muy variadas, como por ejemplo el empleo de enzimas celulares, virales o ambas (*Mohr et al., 2007*).

En las células infectadas por virus, los ARNm virales pueden coexistir con los ARNm celulares sin que exista competición en el proceso de traducción; en otros casos, no sólo se produce la competición entre ambos ARNm, sino que la actividad de diferentes proteínas virales puede inhibir profundamente la síntesis de proteínas celulares, en un proceso comúnmente denominado *shut off* (*Mohr et al., 2007*).

Los organismos pluricelulares han desarrollado mecanismos de protección antiviral muy sofisticados que, en células de mamífero, suceden en tres fases. En la primera fase, se produce la activación de mecanismos innatos autónomos, como ARN de interferencia, citidín desaminación y apoptosis, que son constitutivos y no requieren agentes externos para su inducción. En la segunda fase, intervienen mecanismos innatos provocados por la exposición a virus y otros estímulos, e inducidos por factores solubles del sistema inmunológico, como el IFN. La tercera fase es la inmunidad adaptativa, que se provoca por la exposición a antígenos y se traduce en una respuesta específica duradera a través de anticuerpos y linfocitos (*Mohr et al., 2007*).

La apoptosis y la inducción de IFN afectan al proceso de traducción muy directamente y en rutas muy relacionadas: los factores de inicio de la traducción son las principales dianas de corte proteolítico (en el caso de la apoptosis) y de modificación (en el caso del IFN). Las defensas de la célula huésped pueden provocar muerte celular o bloquear la síntesis de proteínas, a expensas de sacrificar un número pequeño de células infectadas, para contener la replicación del virus y su

propagación. La eIF2 α quinasa PKR desempeña una labor de gran importancia en llevar a cabo estos procesos (*Mohr et al., 2007*).

3.5.1. Estrategias virales en la traducción de ARNm

Los virus dependen de la maquinaria traduccional celular y han evolucionado para aprovecharse de ella de muchas formas. Estos mecanismos operan principalmente en la iniciación de la traducción, pero también en las etapas de elongación y terminación. Suelen basarse en alternativas al rastreo cap-dependiente del ARNm (*Kozak, 1989*), empleando señales específicas que permiten evadir los mecanismos estándar de traducción.

3.5.1.1. Síntesis de poliproteínas

Muchos ARNm virales codifican diferentes proteínas relacionadas como un polipéptido que es traducido a partir de un único codón de inicio y hasta un único codón de terminación. Posteriormente, este polipéptido es cortado proteolíticamente para liberar las proteínas maduras. Este mecanismo le permite al virus realizar un uso moderado de la maquinaria traduccional de la célula para sintetizar sus proteínas (*Mohr et al., 2007*). Por ejemplo, el primer producto de la traducción del ARNm *env* del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1) da lugar a la proteína precursora de la envuelta gp160; después del corte proteolítico realizado por proteasas celulares, se obtienen dos proteínas, gp120 y gp41 (*Robey et al., 1985*).

3.5.1.2. Sitios de iniciación internos (IRES)

Ciertos ARNm virales y ARNm celulares que codifican proteínas implicadas en control del crecimiento, diferenciación, apoptosis y oncogénesis contienen regiones no traducidas, a menudo muy conservadas, que presentan amplias estructuras secundarias y terciarias (*Doudna and Sarnow, 2007*). La mayoría de estos ARNm son poco traducidos (*Kozak, 1991*), pero en algunos casos emplean mecanismos de iniciación alternativos mediante lugares internos de unión a ribosomas (cap-independientes). Este tipo de región se denomina sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) (*Hellen and Sarnow, 2001; Jackson, 2005*). No se conocen proteínas virales esenciales para la función de los IRES, pero sí se han descrito muchos factores celulares transactivadores de IRES (ITAF) que incrementan la función de estos elementos internos (*Mohr et al., 2007*).

El virus VIH-1 y su homólogo en simios, VIS, poseen dos tipos de elementos IRES, a pesar de que sus ARNm tienen estructura cap y están poliadenilados. El primer tipo se encuentra en la secuencia líder 5', mientras que el otro tipo está localizado internamente en el gen *gag* (Brasey *et al.*, 2003; Buck *et al.*, 2001; Herbreteau *et al.*, 2005; Nicholson *et al.*, 2006). La función de estos elementos IRES en la replicación viral es desconocida, aunque podrían servir para producir una proteína o una isoforma bajo condiciones específicas, como, por ejemplo, durante una fase concreta del ciclo celular (Mohr *et al.*, 2007).

3.5.1.3. Otras estrategias

Existen otros tipos de estrategias virales tales como el rastreo ribosomal discontinuo (*ribosome shunting*), el empleo de un codón de inicio posterior a otro codón AUG que escapa al proceso de rastreo (*leaky scanning*), el desplazamiento en el marco de lectura (*frameshifting*) o la lectura a través de codones de terminación débiles (*readthrough*) (Mohr *et al.*, 2007).

3.5.2. Defensas antivirales y traducción

3.5.2.1. Apoptosis

La mayoría de las infecciones virales desencadenan la activación de apoptosis en células de mamífero. Este suceso se produce como resultado de interacciones entre el virus y receptores de la superficie celular, o de alteraciones provocadas por el virus en los sistemas celulares, pudiendo implicar a la transcripción y a la traducción (Mohr *et al.*, 2007).

La activación de la apoptosis durante la infección viral es una maniobra de defensa que provoca la eliminación de las células infectadas. Las señales apoptóticas se transmiten mediante rutas de señalización y son ejecutadas a través de la activación de caspasas, que cortan proteolíticamente muchas proteínas celulares, incluyendo factores implicados en la traducción como eIF4GI, eIF4GII, eIF2 α , eIF4B y 4E-BP1 (Bushell *et al.*, 2000; Satoh *et al.*, 1999).

Existen virus, como los que causan infecciones latentes, que evitan la inducción de apoptosis; mientras que, muchos de los que sí provocan apoptosis, han desarrollado métodos para impedir este proceso (Mohr *et al.*, 2007).

3.5.2.2. Síntesis de interferón

Las moléculas de IFN son citoquinas liberadas por las células infectadas, que inducen efectores que actúan contra la infección viral. Cuando se reconoce la infección viral, se secreta interferón tipo I, α y β , que interviene en la capacidad de la célula de actuar sobre la replicación del virus (*Levy et al., 2003*). El IFN secretado se une a receptores de las células circundantes e induce la expresión de más de cien genes diferentes, como el gen *pkr*, dando lugar al denominado estado antiviral de la célula (*Mohr et al., 2007*).

3.5.2.3. Activación de PKR

La eIF2 α quinasa PKR es la única proteína inducida por IFN que ejerce un efecto directo en la apoptosis a través de la inhibición de la síntesis de proteínas. PKR se activa en respuesta a ARNdc y a ARNmc con estructura secundaria producidos durante la infección por diferentes tipos de virus, provocando la fosforilación del factor eIF2 α e inhibiendo la síntesis de proteínas (*Mohr et al., 2007*).

Por otro lado, PKR puede provocar apoptosis a través de la fosforilación indirecta del inhibidor de la quinasa del factor de transcripción NF- κ B (IKK) y la activación de NF- κ B (*Gil and Esteban, 2000*). Este suceso puede desencadenar la activación tanto de genes proapoptóticos como antiapoptóticos, por lo que la inducción de apoptosis mediante esta vía es un proceso que no se conoce por completo (*Mohr et al., 2007*).

El regulador de ciclo celular p53, que también es inducido por IFN, es regulado negativamente en su traducción mediante PKR durante la infección por algunos virus, lo que causa la entrada en apoptosis (*Mohr et al., 2007*).

A pesar del importante papel que desempeña PKR en respuesta a infecciones virales, parece ser que esta quinasa no es esencial en la inmunidad innata en infecciones por algunos virus como el virus de la encefalomiocarditis, el virus vaccinia, el virus Sindbis y el virus influenza (*Abraham et al., 1999; Yang et al., 1995*).

3.5.2.4. Activación de GCN2

GCN2 es otra eIF2 α quinasa que también está implicada en la respuesta a infección viral. Además de activarse por ARNt no cargados, también es capaz de hacerlo en respuesta a ARN de diferentes virus, como Sindbis, *in vitro*. Parece ser que GCN2 se activa en respuesta al ARN del virus Sindbis a través de su dominio HisRS, y que dicha activación es dependiente del motivo m2 de este dominio (Berlanga *et al.*, 2006).

Por otro lado, GCN2 también se activa en células infectadas por el virus Sindbis y bloquea la traducción viral temprana de ARN genómico; mientras que en células que no expresan esta quinasa, aumenta la permisividad a la infección por este virus (Berlanga *et al.*, 2006).

4. VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH)

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es el causante del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) en humanos, que se caracteriza por la disminución del número de células T CD4+ colaboradoras, y que conduce a una disfunción progresiva del sistema inmunológico. Este suceso permite el desarrollo de infecciones oportunistas que llevan a la muerte del paciente.

4.1. TAXONOMÍA DEL VIRUS VIH

El virus VIH pertenece al género Lentivirus de la familia *Retroviridae* (Barre-Sinoussi *et al.*, 1983; Chermann *et al.*, 1983) y fue identificado en el año 1983. Los lentivirus son virus causantes de enfermedades progresivas de lento desarrollo y que se caracterizan por provocar la reducción del número de células T CD4+ (Fauci, 1988) y graves trastornos inmunológicos y neurológicos.

Se han identificado dos tipos de virus VIH: VIH-1 y VIH-2 (Clavel *et al.*, 1986). El tipo VIH-1 se distribuye por todo el mundo, es muy virulento y el causante de la infección global por VIH; mientras que el tipo VIH-2 es menos patogénico y se encuentra confinado en el oeste de África. Ambos tipos comparten un 40-50% de homología en su secuencia.

4.2. ESTRUCTURA Y ORGANIZACIÓN GENÓMICA

El virus VIH-1 es un virus de aproximadamente 100 nanómetros compuesto por una envuelta que se origina a partir de la membrana de la célula infectada. En su interior se encuentra una cápsida que contiene el genoma viral, compuesto por dos moléculas de ARN monocatenario idénticas que poseen una estructura cap en el extremo 5' y una cola de poli(A) en el extremo 3', y por varias proteínas con actividad enzimática (**Figura 5**).

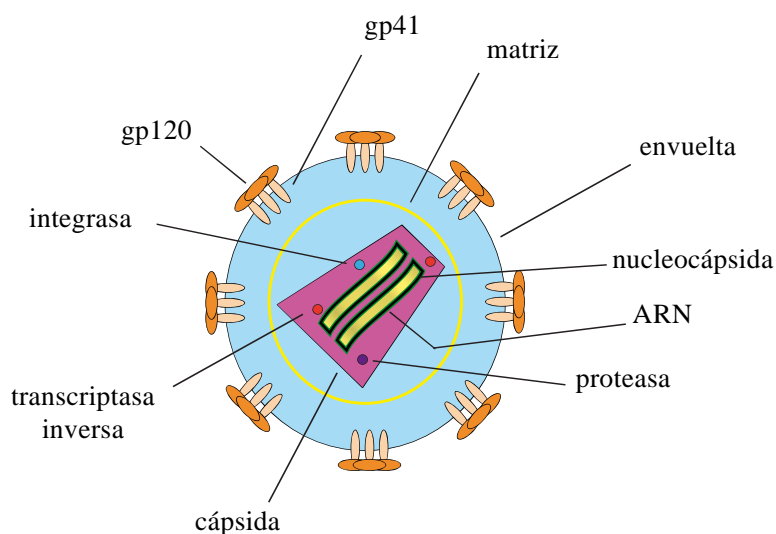


FIGURA 5: Estructura del virus VIH-1.

El genoma del virus VIH-1, de aproximadamente 10 kb, consta de 3 genes estructurales (*gag*, *pol* y *env*), 2 genes que codifican proteínas reguladoras (*tat* y *rev*) y 4 genes que codifican proteínas auxiliares (*vpr*, *vif*, *vpu* y *nef*) (Seelamgari *et al.*, 2004). En ambos extremos del genoma viral se encuentran dos regiones de secuencias repetidas, típicas de los retrovirus, denominadas LTR (*long terminal repeat*) (**Figura 6**).

4.2.1. Genes estructurales

El gen *gag* codifica una proteína precursora (Gag/p55) que posteriormente es cortada por la propia proteasa del virus para dar lugar a la proteína de la matriz (p17), la proteína de la cápsida (p24), la proteína de la nucleocápsida (p9) y la proteína p6 (Gottlinger *et al.*, 1989).

Las proteínas con actividad enzimática del virus VIH-1 siempre se expresan a partir de la proteína precursora de fusión Gag-Pol (gen *gag* y gen *pol*). Este precursor

(p160) se genera a partir de un desplazamiento en el marco de lectura que es provocado por un motivo de ARN específico (*Parkin et al., 1992*). La relación Gag:Gag-Pol es aproximadamente 20:1 porque, cuando los ribosomas encuentran este motivo, este fenómeno sucede el 5% de las veces. Durante la maduración viral, la proteasa del virus corta el precursor Gag-Pol, y después el polipéptido Pol, para generar la proteasa (p10), la transcriptasa inversa o retrotranscriptasa (RT, p66/p51) y la integrasa (p31). La actividad de la proteasa no es totalmente eficiente, manteniéndose algunos precursores sin procesar.

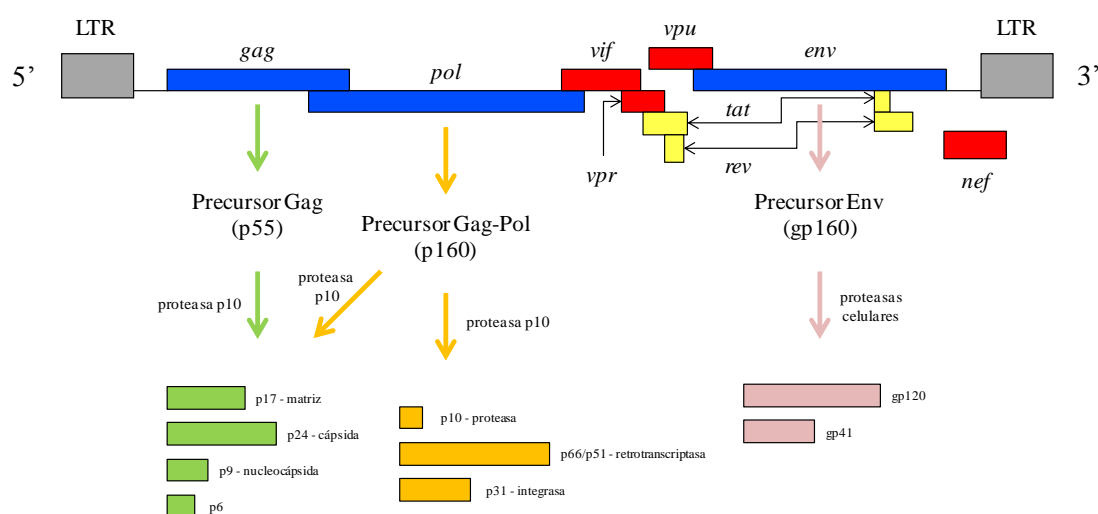


FIGURA 6: Estructura y organización genómica del virus VIH-1. El genoma de VIH-1, de aproximadamente 10 kb, consta de tres tipos de genes: 3 genes estructurales (*gag*, *pol* y *env*), 2 genes reguladores (*tat* y *rev*) y 4 genes auxiliares (*vpr*, *vif*, *vpu* y *nef*). Además, existen secuencias repetidas situadas en ambos extremos denominadas LTR. Por otro lado, los genes estructurales codifican proteínas precursoras que serán procesadas por proteasas celulares (precursor Env) o por la propia proteasa del virus (precursores Gag y Gag-Pol) para dar lugar a las proteínas del virus.

El gen *env* codifica un precursor (Env/gp160) que es glicosilado en el complejo de Golgi (*Capon and Ward, 1991*), y cortado por proteasas celulares para dar lugar a las proteínas de la envuelta gp41 y gp120. La proteína gp41 es una proteína transmembrana, mientras que gp120 se encuentra en la superficie, unida a gp41 mediante interacciones no covalentes (*Bernstein et al., 1995*).

4.2.2. Genes reguladores

El gen *tat* codifica la proteína Tat (14 kD), que actúa como un potente transactivador necesario para la replicación del virus. Tat induce cambios en la cromatina y recluta factores de elongación de la transcripción que forman complejos

proteicos en la región 5' LTR de VIH-1. Esta proteína regula la expresión de los genes virales modulando la actividad y la asociación de estos factores de transcripción con la ARN polimerasa II (*Bharucha et al., 2002; Karn, 1999; Roebuck and Saifuddin, 1999*). Además, Tat interviene en el avance y desarrollo de la enfermedad interfiriendo en procesos celulares como proliferación, diferenciación y apoptosis (*Ambrosino et al., 2002*).

El gen *rev* codifica la fosfoproteína Rev, que está implicada en el transporte núcleo-citoplasma de los ARN virales. Esta proteína se une al elemento de respuesta a Rev (RRE), que se trata de una región con estructura secundaria localizada en el gen *env* de aquellos ARN virales que no han sufrido el proceso de *splicing* o sólo de manera parcial. Durante fases tempranas, se sintetiza la proteína Rev (al igual que Tat y Nef), entra de nuevo al núcleo de la célula infectada, se une a la región RRE y favorece el transporte hacia el citoplasma de ARN virales que darán lugar al resto de las proteínas virales (*Seelamgari et al., 2004*).

4.2.3. Genes auxiliares

El gen *nef* codifica una fosfoproteína (Nef) que interviene de manera crucial en la replicación viral y en el desarrollo de la enfermedad. Se considera a esta proteína como un marcador crítico de patogénesis (*Anderson and Hope, 2003; Deacon et al., 1995; Tobiume et al., 2002*).

El gen *vpr* codifica la proteína Vpr, responsable de la replicación y la patogénesis en las fases tempranas de la infección. Las dos principales funciones de Vpr son transportar el complejo de preintegración del virus y, en fases posteriores de la infección, inducir la parada en la fase G₂ del ciclo celular. Además, también interviene en la localización nuclear, apoptosis, y transactivación de la región LTR y otros promotores celulares (*Philippon et al., 1999; Sherman et al., 2002; Tungaturthi et al., 2003; Yao et al., 2002; Zhang et al., 2001*).

El gen *vif* codifica la proteína Vif, que es expresada en fases tardías de la infección, de manera dependiente de Rev (*Schwartz et al., 1991*), y se encuentra localizada en gran parte en el citoplasma (*Goncalves et al., 1994; Karczewski and Strebel, 1996*). Vif parece favorecer la infectividad del virus y aumenta la estabilidad de los viriones, evitando una posible degradación (*Ohagen and Gabuzda, 2000*). Por otro lado, parece ser que Vif evita mutaciones en el genoma viral, interviniendo en la

ubiquitinación y degradación de la proteína APOBEC3G, una citidín desaminasa celular (*Mangeat et al., 2003; Sheehy et al., 2002; Zhang et al., 2003*).

El gen *vpu* codifica la proteína Vpu, que se trata de una proteína de membrana que forma canales iónicos en las membranas lipídicas, y que incrementa la permeabilidad a diferentes moléculas (*Gonzalez and Carrasco, 1998*). Esta proteína realiza dos funciones principales en el ciclo del virus: induce la degradación de los receptores CD4 de las células infectadas e incrementa la liberación de viriones (*Callahan et al., 1998; Schubert et al., 1996*). Por otro lado, del mismo modo que Tat y Vpr, Vpu está implicada en procesos de apoptosis.

4.3. TROPISMO Y CICLO DEL VIRUS VIH-1

El virus VIH-1 infecta principalmente a células CD4+, como los linfocitos T colaboradores CD4+, monocitos/macrófagos y células dendríticas (*Dalgleish et al., 1984*) (**Figura 7**). El virus entra en las células mediante fusión y endocitosis (*Bernstein et al., 1995; Chambers et al., 1990*). La infección comienza con la unión de la glicoproteína gp120 de la envuelta del virus con el receptor CD4 de la célula (*Bour et al., 1995*). La entrada del virus requiere también la interacción de gp120 con un correceptor: CCR5 (virus R5 trópicos) y/o CXCR4 (virus X4 trópicos) (*Kozak et al., 1997; Maddon et al., 1986; Platt et al., 1998*). La interacción de gp120 con CD4 provoca cambios conformacionales en gp120 que contribuyen a la exposición de una región que se une al correceptor. Esta nueva interacción causa modificaciones en gp41 que desencadenan la fusión de la membrana de la célula infectada y la membrana viral (*Chan et al., 1997*). Posteriormente, el genoma y las proteínas virales son liberados al citoplasma de la célula.

Una vez dentro de la célula, el ARN viral es empleado como molde por la RT para sintetizar ADNdc. La RT tiene varias actividades que permiten esta síntesis: es una ADN polimerasa que puede ser dependiente tanto de ADN como de ARN; una vez formada la primera cadena de ADN, complementaria del ARN viral, su actividad ARNasa separa ambas cadenas; después, sintetiza ADN tomando como molde la cadena de ADN que se formó (*Jonckheere et al., 2000*). El ADNdc generado se integra en el genoma de la célula infectada mediante la intervención de la integrasa viral, y se mantiene flanqueado en ambos extremos por las LTRs.

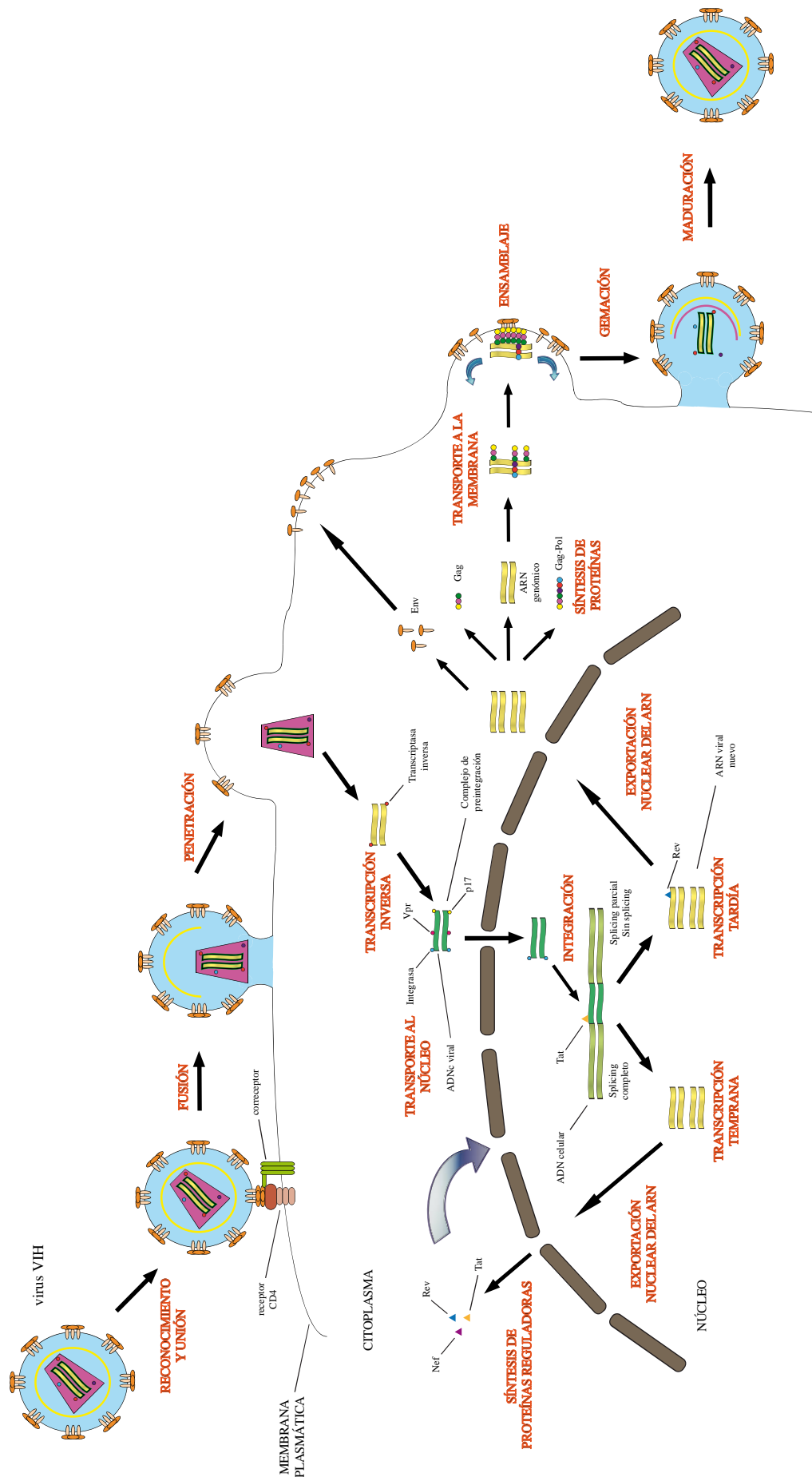


FIGURA 7: Ciclo biológico del virus VIH-1. Representación esquemática del ciclo de replicación del virus VIH. En primer lugar, el virus reconoce y se une a la célula diana a través de sus proteínas de la envuelta, que interaccionan con un receptor y un correceptor celulares. Posteriormente, el virus se fusiona a la célula y libera su material genético y sus proteínas al citoplasma celular. Se produce la transcripción inversa del ARN viral, y el ADN complementario (ADNc) se integra en el genoma de la célula, para lo cual intervienen dos proteínas virales, la retrotranscriptasa y la integrasa, respectivamente. En primer lugar, se produce la transcripción de determinados genes reguladores, y las proteínas que codifican permiten la expresión del resto de los genes del virus. Cuando se sintetiza el resto de las proteínas virales, se asocian junto con el ARN viral y se transportan hacia la membrana de la célula, donde comienzan a originar la estructura del virus. Mediante un proceso de gemación el virus es liberado y termina de madurar, siendo entonces capaz de infectar a otra célula.

La ARN polimerasa II celular se une al extremo 5' LTR, y se inicia la transcripción del ADN proviral. Esta polimerasa es reclutada al extremo 5' junto con la proteína viral Tat, que se encuentra unida a una región del genoma viral con estructura secundaria de horquilla denominada TAR (*transactivation response region*). En ausencia de la proteína Tat se inicia la transcripción, pero la fase de elongación se bloquea o no es eficiente (*Ben Haij et al., 2011*).

Después del procesamiento del ARNm viral y la traducción, las proteínas y el ARN virales se empaquetan junto a la membrana de la célula infectada, se forman vesículas que los engloban, y se liberan las partículas virales al exterior (*Ben Haij et al., 2011*).

4.4. TRANSACTIVACIÓN DEL GENOMA DE VIH-1

La proteína Tat transactiva el genoma de VIH-1 favoreciendo la iniciación de la transcripción y estabilizando la fase de elongación. La región 5' LTR contiene el elemento TAR, una secuencia líder de 59 residuos, con estructura secundaria, que se encuentra posterior a regiones que son diana de diferentes factores de transcripción celulares. La estructura secundaria de esta región es fundamental para la activación de la proteína Tat (*Harrich et al., 2000; Karn, 1999; Naryshkin et al., 1998*). La actividad transactivadora de Tat se incrementa cuando factores de transcripción celulares, como AP1, Oct, Sp1 y NF- κ B, intervienen y se unen al genoma viral (*Berkhout and Jeang, 1992*); también se favorece por la existencia de una secuencia previa a la región TAR, denominada elemento TATA (*Olsen and Rosen, 1992*).

4.5. ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNA TAT

La proteína Tat se encuentra codificada por dos exones (el primer exón codifica los primeros 72 aminoácidos) separados por una región no codificante. El tamaño de esta proteína se encuentra en un rango de 86 a 101 aminoácidos para el virus VIH-1, mientras que tiene 130 aminoácidos en el caso de VIH-2 (*Johri et al., 2011*). La forma predominante aislada de pacientes es la de 101 aminoácidos (**Figura 7**).

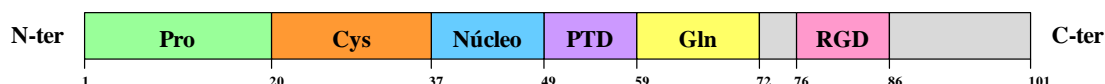


FIGURA 7: Estructura de la proteína Tat de VIH-1.

La secuencia de la proteína Tat se puede dividir en seis dominios funcionales: una región amino terminal rica en residuos de prolina, seguida de una región con abundantes residuos de cisteína, un núcleo hidrofóbico, una región básica, una zona rica en residuos de glutamina y una región carboxilo terminal que contiene un tripéptido arginina-glicina-aspartico (RGD). La región básica es denominada también dominio de transducción de proteínas (PTD), que le confiere a Tat la capacidad de atravesar membranas. No se conocen muchos datos acerca del mecanismo de secreción de Tat de las células infectadas y de la entrada a células sanas; sin embargo, se cree que no posee ninguna secuencia señal y que la secreción es a través de un mecanismo no convencional. Las moléculas liberadas pueden ser atrapadas, particularmente por las moléculas de heparán sulfato que constituyen la matriz extracelular (*Ben Haij et al., 2011*).

Tat pertenece a la familia de proteínas intrínsecamente sin estructura superior (*Bayer et al., 1995; Foucault et al., 2010*), con ausencia de hélices α y láminas β , pero con presencia de estructuras T (β -turn). Parece ser que la forma activa de Tat es independiente de la conformación y quizás sólo una pequeña variación en su estructura es necesaria para su función (*Ben Haij et al., 2011*).

5. INFECCIÓN POR VIH Y REGULACIÓN DE LA TRADUCCIÓN

Durante la infección aguda por VIH-1 aumenta la expresión de genes que codifican proteínas implicadas en la activación del sistema inmunológico (*Li et al., 2009; Solis et al., 2006*), como es el caso del IFN. La producción de IFN

desencadena la activación de determinados genes cuya actividad va dirigida a frenar el desarrollo de la enfermedad. Una de las principales proteínas reguladas mediante este sistema es la eIF2 α quinasa PKR (*Clerzius et al., 2011*).

5.1. ACTIVACIÓN Y REGULACIÓN DE PKR EN RESPUESTA A ARN DE VIH-1

PKR se activa en presencia de ARNdc, moléculas polianiónicas, proteínas activadoras, como la proteína PACT, y otros tipos de estímulos. PKR es activada en presencia de pequeñas concentraciones de ARN TAR *in vitro*, mientras que elevadas concentraciones provocan la inhibición de la quinasa (*Carpick et al., 1997; Kim et al., 2006; Maitra et al., 1994*). En cultivos celulares, la sobreexpresión de PKR provoca una potente inhibición de la expresión de VIH-1 y de la replicación viral (*Adelson et al., 1999; Benkirane et al., 1997; Clerzius et al., 2009; Daher et al., 2001; Dimitrova et al., 2005; Muto et al., 1999*). Sin embargo, el virus VIH-1 puede replicar eficientemente en muchas líneas celulares y cultivos primarios permisivos a pesar de la actividad inhibitoria de PKR.

Existen varios mecanismos de regulación de la activación y la actividad de PKR en respuesta a ARN de VIH-1 que impiden el efecto inhibitorio de la quinasa sobre la replicación del virus.

5.1.2. Inhibición mediante la unión de proteínas celulares a PKR

Las proteínas celulares ADAR1 y TRBP, ambas con dominios de unión a ARN, pueden secuestrar a la quinasa uniéndose a ella y evitando que PKR se pueda unir al ARN viral (*Benkirane et al., 1997; Blair et al., 1995; Clerzius et al., 2009; Daher et al., 2001; Duarte et al., 2000*).

5.1.3. Inhibición mediante la unión de proteínas celulares a ARN TAR de VIH-1

La proteína TRBP incrementa la expresión de VIH-1 y la replicación *in vivo* (*Battisti et al., 2003; Benkirane et al., 1997; Daher et al., 2001; Ong et al., 2005*). Esta proteína incrementa la traducción viral mediante interacciones directas con ARN TAR (*Dorin et al., 2003*), compitiendo con PKR por la unión al ARN viral (*Park et al., 1994*).

5.1.4. Inhibición mediante la unión de proteínas celulares a activadores de PKR

La proteína PACT, y su homólogo en ratones, RAX, son proteínas con dominios de unión a ARN que activan a PKR (*Ito et al., 1999; Pataer et al., 2002; Patel and Sen, 1998; Vorburger et al., 2002*), y que inducen apoptosis en respuesta a estrés a través de esta activación (*Ito et al., 1999; Patel et al., 2000*). TRBP puede unirse a este activador, compitiendo con PKR, y provocar la inhibición de la quinasa (*Daher et al., 2009; Gupta et al., 2003; Huang et al., 2002; Laraki et al., 2008; Peters et al., 2001*).

5.1.5. Inhibición provocada por la proteína Tat

Existe discrepancia en relación con este asunto porque diferentes grupos han publicado resultados algo contradictorios.

Se ha descrito que la proteína Tat de VIH-1 actúa como inhibidor de la activación de PKR por su capacidad de unirse a ARN TAR, secuestrando el ARN del virus. Pero además, Tat puede inhibir a PKR de manera independiente de ARN, uniéndose directamente a ella; Tat reduce la fosforilación de PKR y actúa como un inhibidor competitivo *in vitro* porque ocupa el lugar de unión de eIF2 α a PKR (*Brand et al., 1997; Cai et al., 2000*). Tras la unión, PKR fosforila a Tat, incrementando la actividad transactivadora sobre el genoma de VIH-1, aunque el alcance de la fosforilación depende de la activación previa de PKR en respuesta a ARN del virus (*Endo-Munoz et al., 2005*).

Sin embargo, existen datos en contra de la actividad inhibitoria de Tat sobre la activación de PKR. Estudios posteriores acerca de la interacción de Tat y PKR demuestran que la presencia de esta proteína viral en cultivos celulares induce la actividad de PKR (*Li et al., 2005*). Estas diferencias podrían deberse a la activación de rutas de señalización como consecuencia de la interacción de Tat con la membrana plasmática y/o por su internalización.

5.2. INHIBICIÓN DE LA TRADUCCIÓN POR LA ACTIVIDAD DE LA PROTEASA DE VIH-1

Existe un gran número de proteasas virales que son capaces de degradar proteolíticamente a varios factores de inicio de la traducción, provocando la inhibición de la traducción celular. Es el caso de la proteasa del virus VIH-1, que hidroliza a las proteínas eIF4GI y PABP, bloqueando la iniciación de la traducción

cap- y poli(A) dependiente. Sin embargo, el ARNm de VIH-1 puede ser traducido bajos estas condiciones, dando lugar a la producción de la poliproteína Gag (*Castello et al., 2009*).

OBJETIVOS

La eIF2 α quinasa GCN2 pertenece a una familia de proteínas que se activan durante diferentes situaciones de estrés, incluyendo la infección viral. Después de la activación, fosforilan la subunidad alfa del factor eIF2, regulan negativamente la iniciación de la traducción, y promueven respuestas celulares que le permiten a la célula adaptarse y sobrevivir a la situación de estrés.

GCN2 posee un dominio regulador que le permite reconocer ARNt deacilados en situaciones de privación de nutrientes, y ARN virales, en caso de infección. Esta última característica le atribuye a la quinasa la capacidad de desarrollar una respuesta antiviral regulando negativamente la replicación de algunos virus, como por ejemplo, el virus Sindbis.

Sin embargo, muchos virus han desarrollado mecanismos que les permiten evadir las respuestas antivirales que generan las células para frenar su replicación.

Por todo ello, nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Estudio de la activación de la eIF2 α quinasa GCN2 en respuesta a ARN del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1).
2. Estudio de la regulación traduccional de GCN2 sobre el ARNm del virus VIH-1.
3. Estudio de los mecanismos de VIH-1 para evadir el efecto antiviral de GCN2: actividad de VIH-1^{Pro} y de la proteína Tat.

***MATERIALES Y
MÉTODOS***

1. BACTERIAS Y CLONACIÓN

1.1. CEPAS Y CRECIMIENTO

Para la realización de este trabajo se empleó la cepa DH5 α de *Escherichia coli* [*F*- Φ 80*lacZ* Δ *M15* Δ (*lacZYA-argF*) *U169 recA1 endA1 hsdR17*(*rK*-, *mK*+) *phoA supE44* λ - *thi-1 gyrA96 relA1*]. La sobreexpresión de fragmentos de GCN2 fusionados a GST se hizo con la cepa BL21(DE3) [*F*- *ompT hsdSB*(*rB*-, *mB*-) *gal dcm* (DE3)].

El crecimiento bacteriano se realizó incubando en medio LB líquido (10 g/l de bactotriptona, 5 g/l de extracto de levadura y 10 g/l de NaCl), suplementado con el antibiótico correspondiente (ampicilina 100 μ g/ml), a 37 °C en agitación durante 16-18 horas. Para la obtención de colonias aisladas, las bacterias fueron incubadas en medio sólido LB-agar (medio LB con 15 g/l de agar bacteriológico) suplementado con el antibiótico correspondiente (ampicilina 100 μ g/ml) en estufa a 37 °C.

1.2. TRANSFORMACIÓN

La obtención de ADN plasmídico se realizó transformando las bacterias competentes mediante choque térmico. Se incubaron 50 μ l de bacterias con 10 μ l de mezcla de ligación o 20-50 ng de ADN plasmídico durante 20 minutos en hielo. A continuación, se las sometió a un choque térmico de 42 °C durante 90 segundos, y se mantuvieron en hielo de nuevo durante 5 minutos. Después de añadir 200 μ l de LB se incubaron a 37 °C en agitación durante 1 hora. Posteriormente, se sembraron en placas de LB suplementado con el antibiótico adecuado y se incubaron en estufa a 37 °C durante 16-18 horas.

1.3. PURIFICACIÓN DE ADN PLASMÍDICO

Los plásmidos se purificaron a partir de cultivos bacterianos (3 ml) que fueron incubados a 37 °C en agitación durante 16-18 horas. La extracción de ADN plasmídico se realizó con el kit comercial de columnas para minipreps, de Promega, o para maxipreps, de Qiagen, cuando la producción era a mayor escala (200-250 ml de cultivo bacteriano).

1.4. PURIFICACIÓN DE GCN2-GST

Se transformaron células *Escherichia coli* BL21 con plásmidos que codifican fragmentos polipeptídicos de GCN2 fusionados a GST. Las bacterias se lisaron por sonicación y las proteínas de fusión fueron purificadas empleando glutation Sefarosa (GE Healthcare) utilizando un método descrito previamente (*Khaleghpour et al., 2001*).

2. MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

2.1. VECTORES DE EXPRESIÓN Y CONSTRUCCIONES

- *pBS-VIH-1*: plásmido utilizado para obtener ARNm genómico de VIH-1 transcrito *in vitro*. Este plásmido deriva del subclonaje del pBH10 (*Ratner et al., 1985*) en el plásmido BlueScript (+/-) (Stratagene).
- *pcDNA-GCN2* y *mutantes puntuales (K618R y m2)* y *de delección (Δ200, ΔCt y Δ200 ΔCt)*: las construcciones que codifican GCN2 silvestre y los mutantes puntuales y de delección se obtuvieron previamente en el laboratorio mediante subclonaje en el plásmido de expresión *pcDNA3.1-Myc-His* (Invitrogen).
- *pcDNA-GCN2 (aa 1-560)* y *pcDNA-GCN2 (aa 561-1649)*: plásmidos derivados del *pcDNA-GCN2* y subclonados en el *pcDNA3.1-Myc-His*, que codifican los fragmentos polipeptídicos de GCN2 indicados.
- *pcDNA-HRI*, *pcDNA-PKR* y *pcDNA-PERK*: las construcciones que codifican las proteínas HRI, PKR y PERK se obtuvieron previamente en el laboratorio mediante subclonaje en el plásmido de expresión *pcDNA3.1-Myc-His* (Invitrogen).
- *pcDNA-Tat-Ha*: plásmido comercial (Addgene) que codifica la proteína Tat etiquetada con el epítipo Ha.
- *pcDNA-Ha*: esta construcción se obtuvo introduciendo la secuencia codificante del epítipo Ha en el plásmido *pcDNA3.1-Myc-His*.
- *pcDNA-Luc*: esta construcción se obtuvo introduciendo la secuencia codificante de la luciferasa en el plásmido *pcDNA3.1-Myc-His*.
- *pGST-mGCN2 (aa 419-1024)* y *pGST-hGCN2 (aa 525-1024)*: plásmidos que codifican los fragmentos polipeptídicos de GCN2 indicados, fusionados a GST, y obtenidos a partir del subclonaje en *pGEX-4T* (GE Healthcare).

- *pLKO.1-Puro*: plásmido comercial (Sigma) utilizado como vector que codifica los ARN interferentes para silenciar la expresión de GCN2 (GCN2 - XM_496066). El código de identificación de los clones que codifican los ARN de interferentes es TRCN0000078648/649/650/651/652.
- *pMD2G* y *pSPAX2*: plásmidos comerciales (Addgene) empleados en la generación de lentivirus para realizar el silenciamiento de expresión de GCN2.
- *pNL4.3.Luc.R-E*: plásmido que codifica el genoma de VIH-1 y que contiene el gen marcador de expresión *luc*, cedido por el Dr. Nathaniel Landau (Connor et al., 1995; He et al., 1995).
- *pNL4.3.GFP.R-E*: plásmido que codifica el genoma de VIH-1 y que contiene el gen marcador de expresión *GFP*, cedido por el Dr. Gustavo del Real (Centro Nacional de Biotecnología, CNB).
- *pT7SVwt*, *pT7SV-VIH-1PR* y *pT7SV-2Apro*: plásmidos empleados para la obtención mediante transcripción *in vitro* del ARNm genómico del virus Sindbis. Este sistema se empleó para expresar en células la proteína de la cápsida del virus Sindbis, la proteasa de VIH-1 y la proteasa 2A del virus de la polio (Castello et al., 2006).
- *pTMI-VIH-1PR*: plásmido que codifica la proteasa de VIH-1 (Elroy-Stein et al., 1989), derivado del *pTMI* (Ventoso et al., 2001).

2.2. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La amplificación de fragmentos de ADN mediante reacción de polimerización en cadena (PCR), se llevó a cabo en un termociclador *Gene Amp PCR System 2400* (Perkin Elmer), según las condiciones requeridas en cada caso. La ADN polimerasa empleada fue *Pfu/Pfu Turbo* (Stratagene), y los nucleótidos se adquirieron de Biotools.

La purificación de los fragmentos amplificados se realizó con el kit comercial *PCR Clean-Up System* de Promega.

2.3. ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

La separación de fragmentos de ADN se llevó a cabo empleando geles de agarosa (0,8% a 1%), que fueron preparados con buffer TAE 1X (Tris-acetato, EDTA). Los marcadores de pares de bases se obtuvieron en el Servicio de Fermentación del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. Se emplearon los

fragmentos resultantes de la actividad de la enzima de restricción *Hind III* sobre el ADN del fago $\phi 29$ o del fago λ .

La visualización de los fragmentos de ADN se realizó utilizando bromuro de etidio (0,5 $\mu\text{g/ml}$) como agente intercalante y exponiendo el gel a luz ultravioleta.

2.4. DIGESTIÓN ENZIMÁTICA DEL ADN Y LIGACIÓN

La digestión enzimática del ADN se realizó con enzimas de restricción de Roche, y para la ligación se empleó la ligasa del fago T4 (Roche).

2.5. SECUENCIACIÓN DE ADN

Las reacciones de secuenciación fueron realizadas por la Unidad de Genómica del Servicio Interdepartamental de Investigación de la Universidad Autónoma de Madrid (SIDI).

2.6. TRANSCRIPCIÓN IN VITRO

Antes de realizar el ensayo de transcripción *in vitro*, se linealizó el plásmido *pBS-VIH-1* con la enzima de restricción *Xba I*, se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa y se purificó con el kit comercial *PCR Clean-Up System* (Promega).

Para realizar el ensayo se empleó el kit comercial MEGAscriptTM T7 de Ambion. Tras la reacción de transcripción, el ADN plasmídico se eliminó por tratamiento con ADNasa I. Se extrajo el ARN con fenol:cloroformo y la fracción acuosa se precipitó con isopropanol. El sedimento se lavó con etanol al 70%, se secó y se resuspendió en agua libre de ARNasa, tratada previamente con dietilpirocarbonato (DEPC).

3. CULTIVO CELULAR

3.1. LÍNEAS CELULARES

- BHK-21: fibroblastos procedentes de riñón de hámster sirio dorado (*Mesocricetus auratus*) recién nacido. Crecimiento en monocapa.
- BHK-A1: células BHK-21 que expresan de manera estable el fragmento carboxilo terminal de la subunidad reguladora de la fosfatasa PP1, GADD34 (*Berlanga et al., 2006*).

- COS-7: línea celular derivada de tejido de riñón de mono verde africano, que contiene integrado el genoma modificado del virus SV40.
- HeLa: línea celular establecida en el año 1951 a partir de un carcinoma cervical procedente de una mujer afroamericana de 31 años de edad. Contienen el genoma integrado del virus del papiloma humano tipo 18 (PVH-18). Crecimiento en monocapa.
- HEK 293: línea celular humana derivada de células embrionarias de riñón transformadas con parte del genoma del adenovirus 5.
- HEK 293T Phoenix: línea celular empaquetadora humana derivada de células 293T, que a su vez proceden de células HEK 293 y que han sido transformadas con adenovirus E1a y portadoras del antígeno T. Se utilizan como generadores de partículas retrovirales.
- Jurkat: línea celular de crecimiento en suspensión establecida a partir de sangre periférica de un individuo varón de 14 años de edad con leucemia linfoblástica aguda.
- MEF GCN2 +/+ y GCN2 -/-: fibroblastos embrionarios de ratón (*Harding et al., 2003*), bien tipo silvestre o bien carente del gen que codifica GCN2.
- MT-2: línea celular linfóide del linaje T CD4+, obtenidas a partir de linfocitos de sangre periférica de pacientes infectados por el virus de la leucemia de las células T humana tipo 1 (HTLV-1) por co-cultivo con linfocitos de sangre de cordón umbilical de un individuo sano (*Miyoshi et al., 1981*).
- PBMC: células de sangre periférica con núcleo circular (linfocitos, monocitos, macrófagos) y de crecimiento en suspensión, procedentes de donantes sanos.
- U87: línea celular adherente procedente de un glioblastoma de grado IV hallado en una mujer caucásica de 44 años de edad.

3.2. MANTENIMIENTO Y MEDIOS DE CULTIVO

Las líneas celulares BHK-21, COS-7, HeLa, HEK 293, HEK 293T Phoenix, MEF y U87 se crecieron en DMEM (Medio *Eagle* Modificado por Dulbecco) suplementado con suero fetal bovino al 10% (v/v), glutamina 2 mM y antibióticos (penicilina-estreptomicina 100 U/ml). El cultivo celular se realizó en monocapa en incubador a 37 °C y con una atmósfera de 5% CO₂ y 95% de humedad. El subcultivo celular se realizó a partir de monocapas confluentes mediante tripsinización con una

mezcla de 0,05% de tripsina y 0,02% EDTA, previo lavado con la misma mezcla, durante 5 minutos. Las células se resuspendieron en medio suplementado y se sembraron en placas (Becton Dickinson).

La línea celular Jurkat se creció en medio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) suplementado del mismo modo que el medio DMEM. Las células en suspensión se diluyeron cada 2 días 1:5 en medio fresco.

Las células MT-2 se crecieron en medio RPMI suplementado con suero fetal bovino al 5% (v/v), glutamina 2 mM y antibióticos (1% ampicilina, 1% cloxacilina y 0,32% gentamicina).

Los PBMC se obtuvieron a partir de sangre periférica de donantes sanos (*Spanish HIV BioBank, AIDS Research Network, RIS*) (*Garcia-Merino et al., 2009*) y mediante gradiente de FicollTM (Pharmacia Fine Chemicals) y centrifugación. Después de varios lavados con PBS, las células se plaquero con RPMI suplementado con suero fetal bovino al 10%, glutamina 2 mM, antibióticos e interleucina 2 (IL-2, 50 IU/ml). Los PBMC fueron estimulados durante 48 horas con fitohemaglutinina (2 µg/ml) e IL-2 (100 IU/ml).

3.3. CONGELACIÓN DE CÉLULAS

Las células fueron preservadas en FCS suplementado con 10% de DMSO estéril, y los criotubos se depositaron a -70 °C en un contenedor de congelación NalgeneTM Cryo 1 °C. Tras varios días, los criotubos se pasaron a un contenedor con nitrógeno líquido.

3.4. TRANSFECCIÓN

3.4.1. Lipofectamina y JetPEITM

Para las transfecciones transitorias se emplearon los reactivos JetPEITM (Polytransfection) o LipofectaminaTM y Plus ReagentTM (Invitrogen), según el protocolo de la casa comercial en cada caso.

3.4.2. Electroporación

3.4.2.1. Electroporación con ARN genómico de virus Sindbis

Las células BHK fueron electroporadas con 30 µg de ARN genómico de Sindbis recombinante en un volumen final de 50 µl (*Castello et al., 2006*). Las

células electroporadas se mantuvieron en cultivo durante 4 horas. Para el marcaje metabólico de proteínas, las células se mantuvieron los últimos 30 minutos en un medio que contenía [^{35}S]Met/Cys (Promix, Amersham) (Berlanga *et al.*, 2006).

3.4.2.2. *Electroporación con ADN genómico de VIH-1*

Las células fueron tripsinizadas con tripsina/EDTA y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se resuspendieron en PBS suplementado con 1,25% DMSO y se añadió el volumen correspondiente a cubetas de electroporación de 0,4 cm (Bio-Rad) que contenían el ADN. Se aplicó un pulso de 250V y 950 μF (electroporador de Bio-Rad) y se recuperaron las células incubándolas a 37 °C en DMEM suplementado.

3.5. *INFECCIÓN*

3.5.1. *Infección con VIH-1*

La producción de virus se realizó amplificando VIH-1_{NL4.3} en células MT-2 (ATCC) o PBMC activados con fitohemaglutinina e IL-2. La titulación viral se evaluó mediante cuantificación de p24^{gag} con un kit comercial de ELISA (Innotest HIV-1 antigen mAb; Innogenetics) (Chonco *et al.*, 2012).

Las células MT-2 y los PBMC fueron infectados con diferentes cantidades de VIH-1_{NL4.3} (10-100 ng de p24^{gag} por 10⁶ células) durante 2 horas. Estas cantidades empleadas equivalen a 1-2 partículas virales por célula (Gordon-Alonso *et al.*, 2012). Las células se lavaron y se mantuvieron en cultivo con medio renovado durante 1-4 días después de la infección.

3.5.2. *Infección con virus Vaccinia-T7*

Las células COS-7 fueron infectadas con el virus recombinante Vaccinia-T7 (vvT7) y transfectadas con diferentes plásmidos (Aldabe *et al.*, 1995).

3.5.3. *Generación de lentivirus y silenciamiento de expresión de GCN2*

Células HEK 293T Phoenix fueron transfectadas utilizando JetPeiTM con los plásmidos pMD2G y pSPAX2, y junto con plásmidos derivados de pLKO.1-Puro que codifican ARN interferentes para silenciar la expresión de GCN2. Los virus generados fueron recogidos a las 24 y a las 48 horas y se emplearon para infectar células HeLa en presencia de polibreno (8 $\mu\text{g/ml}$) (Sigma-Aldrich). La selección de

las células que integraron el genoma viral se realizó utilizando el antibiótico puromicina (1 µg/ml) (Sigma-Aldrich).

3.6. ENSAYO DE RADIACIÓN UV

Las células se lavaron con PBS atemperado y se sometieron a una dosis de radiación UV de 120 mJ/cm². Posteriormente, se añadió medio de cultivo a las células y se mantuvieron en recuperación a 37 °C durante el tiempo requerido.

3.7. RECOGIDA DE CÉLULAS PARA ANÁLISIS

Se retiró el medio DMEM completo y se lavaron y se recogieron las células con PBS o PBS con inhibidores de fosfatasas (90 mM NaF, 17,5 mM β-glicerofosfato y 17,5 mM molibdato sódico). Se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente y los sedimentos conteniendo las células se congelaron inmediatamente en nieve carbónica y se guardaron a -70 °C hasta el momento de su uso para producir extractos celulares.

4. MANIPULACIÓN DE EXTRACTOS CELULARES

4.1. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Se lavaron varias veces con PBS con inhibidores de fosfatasas las células que habían sido transfectadas con el ADN que codifica las proteínas etiquetadas con el epítipo myc y una cola de histidinas. Se recogieron, se lisaron y se purificaron por columna de afinidad TALONTM (Clontech) (*Berlanga et al., 2006*).

4.2. INMUNOPRECIPITACIÓN

Se lavaron las células con PBS con inhibidores de fosfatasas y se lisaron con tampón de lisis (20 mM Tris-HCl pH 8, 200 mM NaCl, 10% glicerol, 1% NP-40, CompleteTM y PhosSTOPTM). A continuación, se incubó el lisado celular con 5 µg de anticuerpo anti-myc y con 30 µl de proteína G Sefarosa (GE Healthcare), en un volumen final de 0,8-1 ml, durante 16-18 horas. Después, se lavaron los inmunocomplejos con tampón de lisis y se emplearon para realizar ensayo de actividad eIF2α quinasa *in vitro*.

4.3. INCUBACIÓN CON PROTEASA DE VIH-1

Extractos citoplásmicos de células HeLa se incubaron con 2,5 ng/µl de proteasa de VIH-1 (VIH-1^{Pro}) recombinante y la reacción se detuvo añadiendo

tampón de carga para electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes (Laemmli, 1970).

4.4. FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR

Se lavaron las células con PBS y se recogieron con PBS-EDTA, se resuspendieron en tampón adecuado (10 mM HEPES pH 7,9, 50 mM NaCl, 0,5 M sacarosa, 0,1 mM EDTA y 0,5% Tritón X-100) y se incubaron en hielo durante 5 minutos. Se realizaron las correspondientes centrifugaciones y se separaron las fracciones nuclear y citoplasmática (Piper *et al.*, 1991).

5. ENSAYOS IN VITRO

5.1. ENSAYO DE ACTIVIDAD eIF2 α QUINASA

Inmunocomplejos o proteínas purificadas por afinidad se ensayaron en un volumen final de 20 μ l de una mezcla de reacción que contenía 0,1 mM ATP, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0,25 mg/ml BSA, 10 mM Tris-HCl pH 7,6, 2 μ g de eIF2 α purificado de conejo y ARN viral (virus Sindbis o VIH-1). En algunos experimentos se incluyó [³²P]- γ -ATP (3 μ Ci) para realizar marcaje radiactivo de las proteínas fosforiladas durante el ensayo. Después de incubar 30 minutos a 30 °C, se detuvo la reacción con 4 μ l de tampón de carga 6X y los resultados se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE), seguido de transferencia a membranas de PVDF (Immobilon-P, Millipore) y autorradiografía. El resultado se analizó empleando películas Amersham HyperfilmTM MP (GE Healthcare) y mediante Western blot con distintos anticuerpos específicos y fosfoespecíficos.

5.2. ENSAYO DE CORTE CON PROTEASAS DE VIH

Preparaciones de GCN2, de ratón y de humano, purificada fueron incubadas con 2,5 ng/ μ l de proteasa recombinante de VIH-1 (cedido por I. Pichova, *Centralised Facility for AIDS Reagents*) o de VIH-2 (cedido por Dr. Bret Shirley y Michael Cappola, *National Institute of Health AIDS Research and Reference Reagent Program, NIAID*) (Rittenhouse *et al.*, 1990) en tampón de reacción adecuado (50 mM fosfato de sodio pH 6, 25 mM NaCl, 5 mM EDTA y 1 mM DTT) durante 3 horas a 30 °C.

Las proteínas de fusión GCN2-GST (50 µg) se incubaron con 1 µg de proteasa de VIH-1 recombinante en un volumen total de 50 µl con el tampón adecuado durante 3 horas a 30 °C.

6. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

6.1. CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD LUCIFERASA

Las células que fueron transfectadas con plásmidos que contenían el gen marcador que codifica la proteína luciferasa fueron lavadas con PBS con inhibidores de fosfatasas y se lisaron con tampón de lisis comercial (*Passive Lysis*, Promega) indicado para cuantificar la actividad luciferasa. Se analizó la actividad luciferasa de volúmenes equivalentes de lisado celular empleando un luminómetro Monolight 2010 (Analytical Luminescence Laboratory) y el reactivo *Luciferase Assay System* (Promega). Posteriormente, se cuantificó la concentración de proteína por el método Bradford, para normalizar la medición de la actividad luciferasa.

6.2. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS

Las proteínas se separaron en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) de porcentaje de entre el 8% y el 15% o en geles en gradiente 5-15% o 5-18%, con los sistemas de minigeles Miniprotean II y III (Bio-Rad). La electroforesis se realizó en tampón Tris-Glicina (25 mM Tris, 192 mM de glicina, SDS 0,1%) y se empleó como marcador de peso molecular Precision Plus ProteinTM All Blue Standards (Bio-Rad).

6.3. TINCIÓN DE COOMASSIE

Las geles se incubaron con una solución de tinción (50% metanol, 7% ácido acético y 0,025% Coomassie Blue G-250) y, posteriormente, en solución de destañido (40% metanol y 10% ácido acético) hasta visualización nítida de bandas.

6.4. TRANSFERENCIA A MEMBRANA DE PVDF

Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF Immobilon-P (Millipore), previamente tratadas con metanol, empleando el sistema de transferencia húmeda de Bio-Rad. Se realizó en el tampón adecuado (25 mM Tris, 192 mM de glicina) durante toda la noche a 30 V y a 4 °C.

6.5. WESTERN BLOT

Las membranas se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con leche desnatada 5% en TBS-T (20 mM Tris-HCl pH 7,6, 500 mM NaCl y 0,01% Tween-20). Después, se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes en solución de bloqueo o en TBS-T BSA 5% a 4 °C durante toda la noche. Después de varios lavados con TBS-T, se incubaron las membranas con el anticuerpo secundario adecuado durante 1 hora y se lavaron de nuevo 5 veces con TBS-T y una vez con TBS. El revelado se llevó a cabo con el sistema de detección Amersham™ ECL™ *Western Blotting Detection Reagents* (GE Healthcare) y utilizando películas Agfa Curix RP2 Plus en una máquina reveladora Kodak M35 X-OMAT.

Cuando fue necesario, se realizaron varios Western blot sobre la misma membrana, previo tratamiento con solución de *stripping* (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, SDS 2% y 100 mM β -mercaptoetanol) para eliminar anticuerpos unidos anteriormente.

Para las inmunoprecipitaciones y el análisis por Western blot se emplearon los siguientes anticuerpos:

- Anti β -actina: monoclonal de ratón que reconoce la proteína β -actina (Sigma).
- Anti caspasa 3: policlonal de conejo que reconoce tanto la procaspasa 3 como la forma activa (#9662, Cell Signaling).
- Anti eIF2 α -P: policlonal de conejo que reconoce de manera específica la serina 51 fosforilada de la subunidad alfa del factor eIF2 (#9721, Cell Signaling).
- Anti eIF2 α : policlonal de conejo que reconoce eIF2 α (sc-11386, Santa Cruz).
- Anti eIF4GI: policlonal de conejo que reconoce el dominio carboxilo terminal del factor eIF4GI (Aldabe *et al.*, 1995).
- Anti GCN2-P: se emplearon dos anticuerpos policlonales de conejo que reconocen de manera específica la treonina 898 fosforilada (#3301, Cell Signaling) o la treonina 899 fosforilada (ab75836, Abcam).
- Anti GCN2: policlonal de conejo que reconoce el dominio quinasa, tanto de la proteína de ratón como de humano (Harding *et al.*, 2000).

- Anti GFP: monoclonal de ratón que reconoce la proteína fluorescente GFP (#11814460, Roche).
- Anti Ha: monoclonal de ratón que reconoce el epítipo Ha (MMS-101R, Covance).
- Anti myc: monoclonal de ratón que reconoce el epítipo myc (EQKLISEEDL) (Sigma).
- Anti p24: se emplearon dos anticuerpos monoclonales de ratón que reconocen la proteína p24 de VIH-1, tanto la propia proteína como los polipéptidos que la contienen (ab9071, Abcam; *Centralised Facility for AIDS Reagents*, NIBSC, Reino Unido).
- Anti p38-P: policlonal de conejo que reconoce de manera específica los residuos treonina 180 y tirosina 182 fosforilados de la MAP quinasa p38 (#9211S, Cell Signaling).
- Anti PABP: policlonal de conejo que reconoce los extremos amino y carboxilo terminal de la proteína PABP (*Imataka et al., 1998*).
- Anti PKR: policlonal de conejo que reconoce la proteína PKR (sc-708, Santa Cruz).

6.6. CUANTIFICACIÓN POR DENSITOMETRÍA

Para realizar la cuantificación densitométrica de la señal obtenida en el Western blot, se utilizó el programa Quantity One y el densitómetro GS-710 de Bio-Rad. Se normalizó cada dato con respecto a la cantidad total de proteína.

El análisis entre muestras se realizó calculando la relación entre ellas dividiendo cada valor por el valor de la muestra control.

6.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos aportados consisten en el valor de la media \pm el error típico de la media (e.t.m). Se realizó la prueba t de Student de dos colas para analizar la significación estadística de los datos, considerando diferencias significativas a partir de $p < 0,05$.

RESULTADOS

1. ESTUDIO DE LA ACTIVACIÓN DE LA *eIF2 α* QUINASA GCN2 EN RESPUESTA A ARN DE VIH-1

1.1. ACTIVACIÓN DE GCN2 EN RESPUESTA A ARN DE VIH-1 *IN VITRO*

Trabajos previos de nuestro grupo han descrito que la *eIF2 α* quinasa GCN2 de mamífero se activa en respuesta a ARN genómico del virus Sindbis (SV) *in vitro* y también en células infectadas con el virus. Además, se comprobó que ratones que no expresan GCN2 son extremadamente susceptibles a sufrir infección después de inocularles por vía intranasal el virus, observándose elevados títulos virales en tejido cerebral en comparación con los animales control. Del mismo modo, se observó un aumento de la permisividad a la infección en fibroblastos derivados de ratones que no expresan esta *eIF2 α* quinasa (Berlanga *et al.*, 2006).

Por lo tanto, puesto que GCN2 es una proteína implicada en la respuesta antiviral frente a diferentes virus ARN, como es el caso de SV, nos planteamos si se podría estar desarrollando un mecanismo similar en respuesta al virus de la inmunodeficiencia humana.

Por todo lo anterior, se realizó ensayo de actividad *eIF2 α* quinasa *in vitro* con GCN2 de ratón purificada por afinidad, en presencia de diferentes concentraciones de ARN de VIH-1; se empleó como control negativo de activación ARN transcrito *in vitro* de GCN2, mientras que el ARN genómico de SV sirvió como control positivo del ensayo (**Figura R1**).

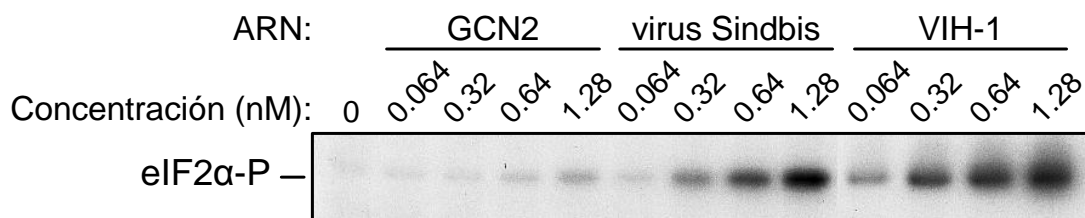


FIGURA R1: Activación de GCN2 y fosforilación de *eIF2 α* en respuesta a ARN de VIH-1 *in vitro*. Se realizó ensayo de actividad *eIF2 α* quinasa *in vitro* con GCN2 de ratón, purificada por columna de afinidad TALONTM, en presencia de concentraciones crecientes de ARN transcrito *in vitro* de GCN2 de ratón, como control negativo, y de ARN genómico de SV y de VIH-1, respectivamente. En este ensayo se empleó [³²P]- γ -ATP para marcar radiactivamente las proteínas fosforiladas durante

el ensayo, cuya presencia se evidenció, tras separarlas en SDS-PAGE, mediante autorradiografía. En la figura se observa la fosforilación de eIF2 α (32 P).

Se puede observar en la autorradiografía que GCN2 fosforiló a eIF2 α a partir de la concentración menor de ARN de VIH-1, y que esta fosforilación aumentó a medida que se incrementaba la concentración de ARN. Estos resultados muestran que, del mismo modo que se había descrito para el ARN del virus Sindbis, la eIF2 α quinasa GCN2 se activa *in vitro* en respuesta al ARN de VIH-1.

La activación de GCN2 en respuesta a ARN de SV reside en su dominio HisRS, ya que si existe una mutación puntual en el motivo m2 de este dominio, no se produce la activación de la quinasa (*Berlanga et al., 2006*). Por ello, decidimos estudiar si la activación de GCN2 en respuesta a ARN de VIH-1 es también dependiente del dominio HisRS. Para comprobarlo, se realizó ensayo de actividad eIF2 α quinasa *in vitro* con GCN2 silvestre, un mutante inactivo (GCN2-K618R) y un mutante puntual del motivo m2 del dominio HisRS (GCN2-m2), purificados por afinidad, en presencia de ARN de SV o de VIH-1 (**Figura R2**).

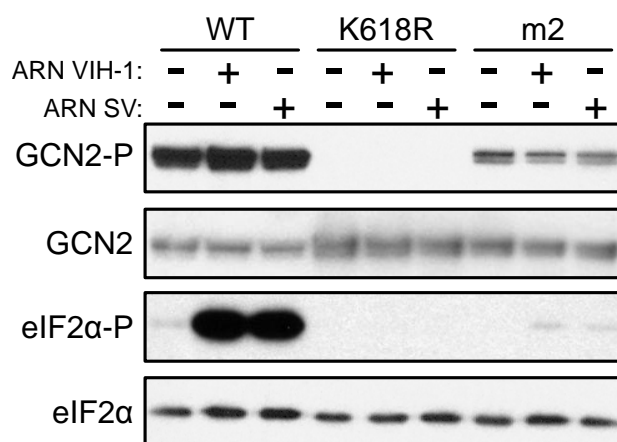


FIGURA R2: La activación de GCN2 en respuesta a ARN de VIH-1 *in vitro* es dependiente de su dominio HisRS. Se sobreexpresaron GCN2 silvestre (*wild type*, WT), un mutante inactivo GCN2-K618R (K618R), y un mutante puntual del dominio HisRS GCN2-m2 (m2), en células HEK 293, y se purificaron mediante columna de afinidad TALON™. Posteriormente, se ensayó su actividad eIF2 α quinasa *in vitro* en presencia de ARN de virus Sindbis o de VIH-1 y se analizó el patrón de fosforilación de GCN2 y de eIF2 α mediante Western blot empleando anticuerpos específicos y fosfoespecíficos.

En este caso, del mismo modo que sucede en la respuesta de GCN2 en presencia de ARN de SV *in vitro* (*Berlanga et al., 2006*), no se observó fosforilación significativa de eIF2 α en el ensayo realizado con el mutante GCN2-m2, y

únicamente GCN2 silvestre se autofosforiló y fosforiló a eIF2 α de forma significativa en el ensayo. Este resultado indica que el dominio HisRS de GCN2 interviene y es necesario durante la activación de la quinasa en respuesta a ARN de VIH-1.

1.2. ACTIVACIÓN DE GCN2 EN CÉLULAS EN LAS QUE SE EXPRESA EL ARN DE VIH-1

Una vez comprobado que la eIF2 α quinasa GCN2 se activa *in vitro* en respuesta a ARN de VIH-1, y que es capaz de fosforilar al factor eIF2, nos planteamos si esta misma situación se podría reproducir en células en las cuales se expresa el ARN del virus. Para ello, se electroporaron varias líneas celulares con cantidades crecientes del plásmido pNL4.3.Luc.R-E- (**Figura R3**), que codifica el genoma de VIH-1, y que contiene un gen marcador que codifica la proteína luciferasa.

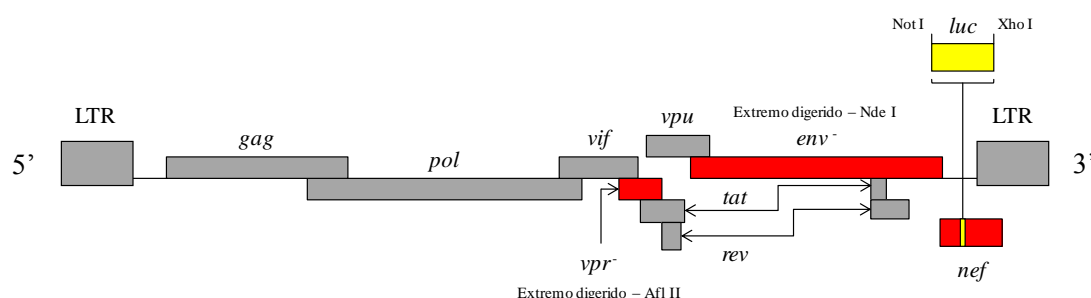


FIGURA R3: Esquema representativo de la estructura del plásmido pNL4.3.Luc.R-E-. El plásmido pNL4.3.Luc.R-E- codifica el genoma de VIH-1, aunque posee modificaciones que bloquean la expresión de determinados genes del virus (indicado en rojo), como es el caso de los genes *vpr* y *env*, por modificación de los extremos de su secuencia, y del gen *nef*, que tiene insertado el gen que expresa la proteína luciferasa (indicado en amarillo). Este plásmido sólo permite un ciclo de replicación y no genera partículas infectivas.

Los resultados obtenidos (**Figura R4**) mostraron un incremento en la fosforilación de GCN2 a medida que aumentaba la cantidad de ADN de VIH-1 empleado, aunque en el caso de las células BHK, Jurkat y U87 (**A**, **C** y **D**) se acabó produciendo un descenso en el patrón de fosforilación con la cantidad más elevada de plásmido, a diferencia de lo que se pudo apreciar con las células HeLa (**B**). Por otro lado, la fosforilación de eIF2 α experimentó un ligero incremento respecto a las células control salvo en el caso de las células HeLa (**B**), donde se observó todo lo contrario, una reducción en la fosforilación de eIF2 α de manera directamente

proporcional a la cantidad de pNL4.3.Luc.R-E-. Se utilizó la activación de la MAPK p38 como control positivo, ya que parece estar implicada en diferentes rutas de activación celulares en infecciones por VIH (*Medders and Kaul, 2011*), y se observó un aumento de la fosforilación de esta quinasa en todos los casos estudiados.

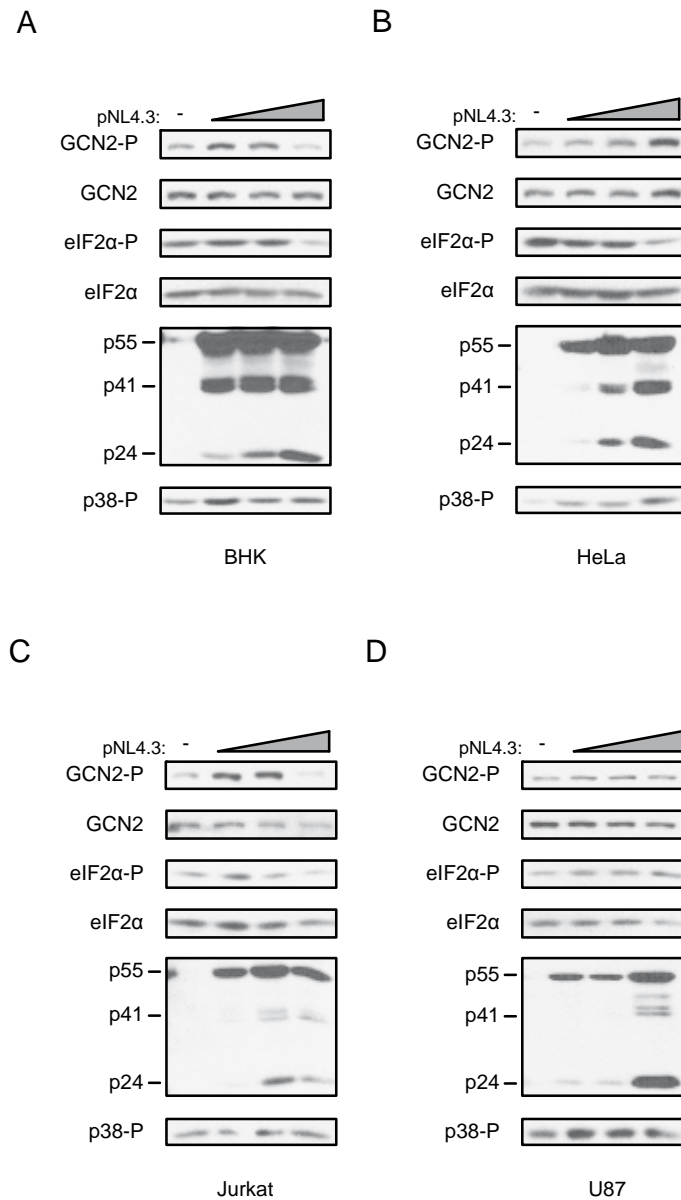


FIGURA R4: Fosforilación de GCN2 en células que expresan el ARNm de VIH-1. Se electroporaron varias líneas celulares (**A**, BHK; **B**, HeLa; **C**, Jurkat; **D**, U87) con diferentes cantidades (20, 30 y 40 μ g) del plásmido pNL4.3.Luc.R-E- y se mantuvieron en cultivo durante 24 horas. Se estudió el patrón de fosforilación de GCN2 y de eIF2 α , así como la activación de la MAPK p38 y la expresión de proteínas virales, mediante Western blot empleando anticuerpos específicos y fosfoespecíficos.

Estos resultados indican que la respuesta de GCN2 fue ligeramente distinta en las líneas celulares empleadas, aunque en todas ellas, a excepción de HeLa, se produjo activación de GCN2 y fosforilación de eIF2 α con cantidades bajas de plásmido.

1.3. ACTIVACIÓN DE GCN2 EN CÉLULAS INFECTADAS CON VIH-1

Para investigar la posible implicación de GCN2 en la respuesta antiviral durante la infección por VIH-1, se infectaron células MT-2 con diferentes cantidades de VIH-1_{NL4.3}, y se mantuvieron en cultivo durante uno y tres días.

Se analizó la fosforilación de eIF2 α , observándose un aumento en las células mantenidas en cultivo durante un día después de la infección, mientras que este efecto disminuyó en las que se mantuvieron durante tres días después de ser infectadas (**Figura R5**). Este hecho parece ser el responsable de la ausencia de expresión de proteínas virales en las células que mostraron un incremento mayor de eIF2 α -P y que fueron infectadas con una menor cantidad viral. Por otro lado, la reducción de los niveles de fosforilación de eIF2 α coincidió con una caída en la cantidad de GCN2, de manera que parece que esta eIF2 α quinasa se activa e interviene en la fosforilación del factor en respuesta a la infección de células MT-2 con VIH-1.

Se ha descrito que el factor de inicio de la traducción eIF4GI es degradado proteolíticamente por la proteasa de VIH-1 (VIH-1^{Pro}), obteniéndose varios fragmentos de degradación: un fragmento amino terminal con una masa molecular aproximada de 140 kDa, y dos fragmentos carboxilo terminal con masas moleculares aproximadas de 102 kDa (Ct-2) y 57 kDa (Ct-3), respectivamente (*Ventoso et al., 2001*). Los fragmentos de degradación Ct-2 y Ct-3 se observaron en las células que se mantuvieron en cultivo durante tres días después de la infección con VIH-1, de modo que todo parecía indicar que la proteasa viral estaba llevando a cabo su actividad proteolítica. Este suceso nos llevó a pensar que es esta enzima viral la responsable de la disminución en la cantidad de GCN2 observada después de la infección de células MT-2 con VIH-1.

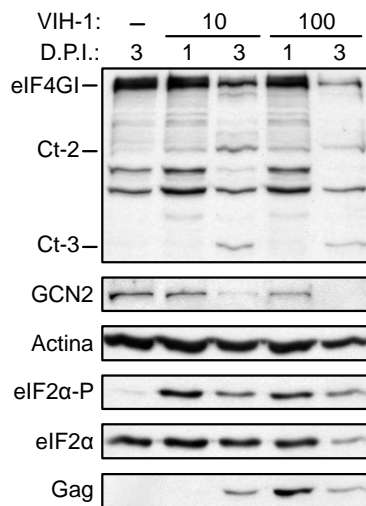


FIGURA R5: Fosforilación de eIF2α y degradación de GCN2 en células infectadas con VIH-1. Células MT-2 fueron infectadas con VIH-1_{NL4.3} (10 o 100 ng de p24^{gag} por 10⁶ células) y se mantuvieron en cultivo durante uno o tres días después de la infección. Se analizó la cantidad de GCN2, la fosforilación de eIF2α y la expresión de proteínas virales y otras proteínas celulares mediante Western blot empleando anticuerpos específicos y fosfoespecíficos. D.P.I.: días postinfección.

2. ESTUDIO DE LA REGULACIÓN TRADUCCIONAL DE GCN2 SOBRE EL ARN DE VIH-1

Los resultados obtenidos en el estudio de la activación de GCN2 en respuesta a ARN de VIH-1, junto con los antecedentes descritos acerca de la función inhibitoria de PKR sobre la expresión y la replicación de VIH-1 (*Adelson et al., 1999; Dimitrova et al., 2005; Muto et al., 1999*), nos hizo preguntarnos si GCN2 podría estar regulando la traducción del ARNm del virus.

2.1. LA REGULACIÓN DE LA TRADUCCIÓN DEL ARNm DE VIH-1 ES DEPENDIENTE DE eIF2

En primer lugar, nos planteamos si, empleando el plásmido pNL4.3.Luc.R-E como sistema de expresión de las proteínas de VIH-1 en células en las cuales no se fosforila la subunidad alfa del factor eIF2, se podría ver favorecida o no la síntesis de proteínas virales. Para ello, se electroporaron, con este plásmido, fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) de tipo silvestre (S/S), junto con otra línea de MEF que posee una mutación puntual en la secuencia que codifica la subunidad alfa del factor eIF2, de modo que la serina 51 es sustituida por una alanina (A/A) (**Figura R6**). Esta mutación provoca que la subunidad alfa no sea susceptible de ser fosforilada por las eIF2α quinasas.

Se analizó la expresión de las proteínas virales mediante la actividad luciferasa observada en ambos tipos celulares, apreciándose un incremento de casi 7 veces en los MEF A/A respecto a los MEF S/S. Este resultado indica claramente que la fosforilación de eIF2α regula negativamente la traducción del ARNm de VIH-1.

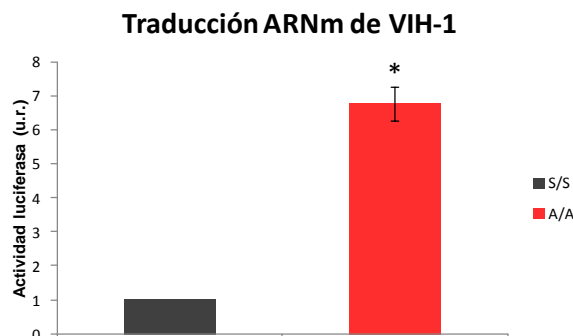


FIGURA R6: La ausencia de fosforilación de eIF2 α favorece la traducción del ARNm de VIH-1. Se electroporaron con el plásmido pNL4.3.Luc.R-E- fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) de tipo silvestre (S/S) y de una línea que posee una sustitución de la serina 51 de la secuencia de la subunidad alfa del factor eIF2 por una alanina (A/A), de modo que no es susceptible de ser fosforilada en este residuo. Las células se mantuvieron en cultivo durante 24 horas después de la electroporación y se analizó la traducción del ARNm de VIH-1 atendiendo a la actividad luciferasa (unidades relativas, u.r.). La medición de la actividad luciferasa se normalizó respecto a la concentración de proteína del lisado celular y respecto a la medida obtenida con las muestras control (pcDNA-Luc). El análisis comparativo entre ambos tipos celulares se realizó asignándole el valor 1 a los MEF S/S. Se representa la media \pm e.t.m. (n=4; * p <0,001).

Por otro lado, para apoyar los resultados obtenidos en células que no fosforilan eIF2 α , se transfectaron células BHK-21 de tipo silvestre y otra línea que sobreexpresa la subunidad reguladora GADD34 de la fosfatasa PP1 (BHK-A1), con el plásmido pNL4.3.GFP.R-E-, que codifica el genoma de VIH-1 y además contiene un gen marcador que codifica la proteína GFP (**Figura R7**).

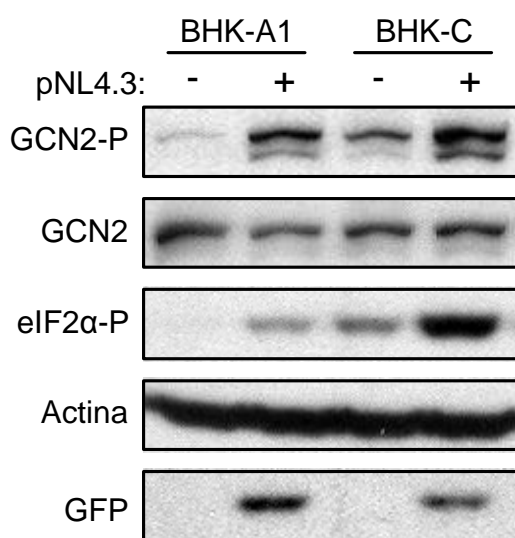


FIGURA R7: La sobreexpresión de GADD34 favorece la traducción del ARNm de VIH-1. Se transfectaron con el plásmido pNL4.3.GFP.R-E- células BHK-21 de tipo silvestre (BHK-C) y de una línea que sobreexpresa la subunidad reguladora GADD34 de la fosfatasa PP1 (BHK-A1), y se mantuvieron en cultivo durante 24 horas. Posteriormente, se analizó el patrón de fosforilación de GCN2 y de eIF2 α , así como la expresión de proteínas celulares y virales (GFP como marcador), mediante Western blot empleando anticuerpos específicos y fosfoespecíficos.

Se pudo observar mediante Western blot que la reducción de la fosforilación de eIF2 α por la sobreexpresión de GADD34 provocó un aumento de la traducción del ARNm de VIH-1. Por otro lado, en ambos casos se produjo un aumento de la fosforilación de GCN2 con respecto a las células control, aunque parece que en las células BHK-A1 el patrón de fosforilación de GCN2 es inferior que en las células BHK-C, incluso de manera basal.

2.2. LA AUSENCIA DE GCN2 FAVORECE LA TRADUCCIÓN DEL ARNm DE VIH-1

Después de comprobar que la ausencia de fosforilación del factor eIF2 favorece la expresión de las proteínas del virus VIH-1, y teniendo en cuenta los resultados obtenidos en relación con la activación de GCN2 en respuesta a ARN de VIH-1 *in vitro* y su posible papel en la regulación traduccional del virus, nos preguntamos si la ausencia de GCN2 podría favorecer la traducción del ARNm de VIH-1.

Se electroporaron MEF tipo silvestre (MEF +/+) y otro tipo celular que carece del gen que codifica GCN2 (MEF GCN2 -/-) con el plásmido pNL4.3.Luc.R-E-, y se mantuvieron en cultivo durante 24 horas. Posteriormente, se analizó la traducción del ARNm de VIH-1 y se comparó entre ambas líneas celulares.

La cuantificación de la actividad luciferasa mostró un incremento de 4 veces en los MEF GCN2 -/- con respecto a los MEF +/+ (**Figura R8A**), sugiriendo que la traducción del ARNm de VIH-1 se ve favorecida en ausencia de GCN2 en estas células.

Por otro lado, se estudió también la traducción del ARNm de VIH-1 analizando mediante Western blot la expresión del polipéptido Gag. Los resultados indican que la expresión de Gag fue muy superior en los MEF GCN2 -/- con respecto a los MEF +/+ (**Figura R8B**), confirmando los resultados obtenidos con la actividad luciferasa.

También se analizó el patrón de fosforilación de GCN2 y de eIF2 α . La quinasa mostró una fosforilación basal bastante elevada, aunque se observó un pequeño aumento en las células que expresaron el ARNm de VIH-1. Sin embargo, no se detectó un aumento de la fosforilación de eIF2 α .

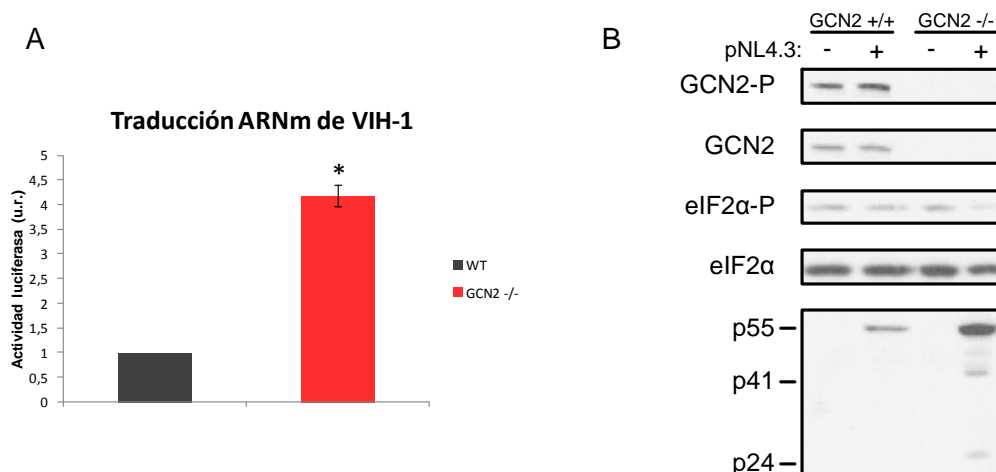


FIGURA R8: La ausencia de GCN2 favorece la traducción del ARNm de VIH-1. (A) Se electroporaron con el plásmido pNL4.3.Luc.R-E- fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) de tipo silvestre (+/+) y de otra línea que carece del gen que codifica GCN2 (GCN2 -/-), se mantuvieron en cultivo durante 24 horas después de la electroporación y se analizó la traducción del ARNm de VIH-1 atendiendo a la actividad luciferasa. La medición de la actividad luciferasa se normalizó respecto a la concentración de proteína del lisado celular y respecto a la medida obtenida con las muestras control (pcDNA-Luc). El análisis comparativo entre ambos tipos celulares se realizó asignándole el valor 1 a los MEF +/+. Se representa la media \pm e.t.m. (n=4; * $p<0,001$). (B) Se analizó mediante Western blot el patrón de fosforilación de GCN2 y de eIF2 α , además de la expresión de proteínas virales, empleando anticuerpos específicos y fosfoespecíficos.

De manera paralela a estos experimentos, células HeLa que expresan de forma estable un ARN de interferencia que silencia la expresión de GCN2, se transfectaron con el plásmido pNL4.3.GFP.R-E-. Las células se mantuvieron 24 horas después de la transfección y se analizó la expresión de proteínas virales (**Figura R9**).

La traducción del ARNm de VIH-1 fue significativamente superior en las células que mantienen silenciada la expresión de GCN2, atendiendo a la mayor cantidad de proteína GFP producida en estas células (**Figura R9A**). La cuantificación de la proteína GFP detectada mediante Western blot indicó un incremento de su expresión de 4 veces en las células que no expresan GCN2 con respecto a las células control (**Figura R9B**). Este resultado coincide con el obtenido en MEF GCN2 -/-, apoyando la idea de que la ausencia de GCN2 favorece en gran medida la traducción del ARNm de VIH-1.

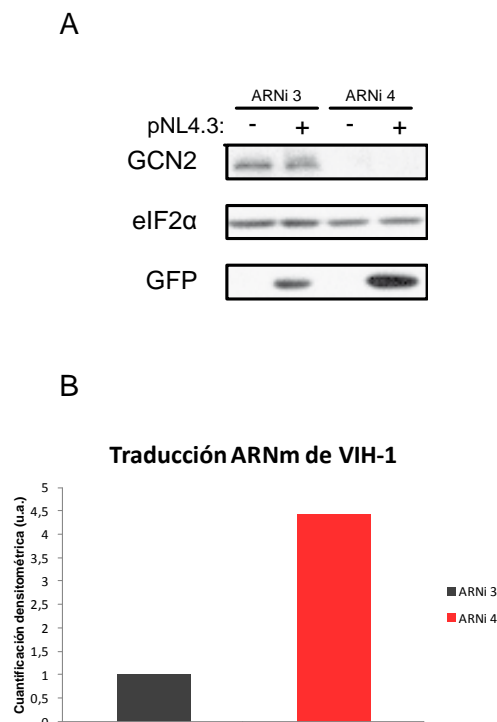


FIGURA R9: El silenciamiento de la expresión de GCN2 favorece la traducción del ARNm de VIH-1. (A) Células que expresan de manera estable ARN interferente (ARNi) que silencia la expresión de GCN2 (ARNi 4) o un ARNi control que no lo hace (ARNi 3) fueron transfectadas con el plásmido pNL4.3.GFP.R-E- y se mantuvieron en cultivo durante 24 horas. Se analizó la expresión de GCN2, eIF2α y proteínas virales (GFP como marcador) mediante Western blot empleando anticuerpos específicos. (B) Representación gráfica de la cuantificación en unidades arbitrarias (u.a.) de la expresión de GFP corrigiendo por cantidad total de proteína de los lisados celulares.

2.3. LA SOBREENPRESIÓN DE GCN2 DISMINUYE LA TRADUCCIÓN DEL ARNm DE VIH-1

Después de comprobar que la ausencia de GCN2 favorece la traducción del ARNm de VIH-1, nos preguntamos si la sobreexpresión de esta eIF2α quinasa provocaría el efecto contrario sobre la síntesis de proteínas virales. Para ello, cotransfectamos células HeLa con el plásmido pNL4.3.Luc.R-E- junto con otro plásmido que codifica GCN2 de humano tipo silvestre o el mutante inactivo GCN2-K618R.

De nuevo, la cuantificación de la traducción del ARNm de VIH-1 se realizó midiendo actividad luciferasa y cantidad de proteínas virales presentes en los extractos celulares (**Figura R10**).

La medida de la actividad luciferasa en ambos casos reveló que las células que sobreexpresan GCN2 silvestre mostraron una menor expresión de proteínas virales en comparación con aquellas que sobreexpresan el mutante inactivo GCN2-K618R, de modo que la presencia de la forma activa de la quinasa regula negativamente la traducción del ARNm de VIH-1 (**Figura R10A**). Por otro lado, se analizaron los resultados mediante Western blot (**Figura R10B**), y se observó que la sobreexpresión de GCN2 tipo silvestre provocó una disminución de la expresión de las proteínas virales, apoyando la conclusión obtenida a través de la medición de la

actividad luciferasa. De nuevo, se observó un aumento de autofosforilación de GCN2, tanto la quinasa endógena como la exógena, con respecto a las células control, aunque no se apreció un efecto similar en el patrón de fosforilación de eIF2 α .

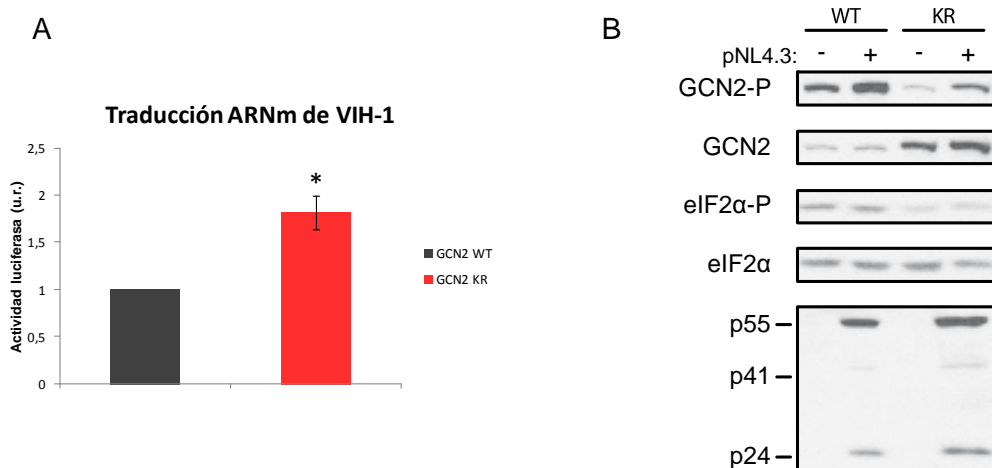


FIGURA R10: La sobreexpresión de GCN2 regula negativamente la traducción del ARNm de VIH-1. (A) Se cotransfectaron células HeLa con el plásmido pNL4.3.Luc.R-E- junto con un plásmido que codifica GCN2 tipo silvestre (GCN2 WT) o un mutante inactivo GCN2-K618R (GCN2 KR), y se mantuvieron las células en cultivo durante 24 horas. Posteriormente, se analizó la expresión de proteínas virales atendiendo a la actividad luciferasa. La medición de la actividad luciferasa se normalizó respecto a la concentración de proteína del lisado celular y respecto a la medida obtenida con las muestras control (pcDNA-Luc). El análisis comparativo entre ambos tipos celulares se realizó asignándole el valor 1 a las células que sobreexpresaron GCN2 WT. Se representa la media \pm e.t.m. (n=6; * $p<0,05$). (B) En el mismo experimento se analizó mediante Western blot de los extractos celulares la cantidad total y la fosforilación de GCN2 y eIF2 α , así como la presencia de proteínas virales, utilizando anticuerpos específicos y fosfoespecíficos.

3. ESTUDIO DE LA DEGRADACIÓN PROTEOLÍTICA DE GCN2 POR LA PROTEASA DE VIH-1

3.1. SAQUINAVIR INHIBE LA DEGRADACIÓN PROTEOLÍTICA DE GCN2 EN CÉLULAS INFECTADAS POR VIH-1

Como se observa en la figura R5, GCN2 parece degradarse en células que han sido infectadas con VIH-1, y puesto que hay antecedentes acerca de la actividad proteolítica de la proteasa del virus sobre proteínas celulares, y más concretamente, sobre proteínas implicadas en el control traduccional (Castello *et al.*, 2009; Ventoso *et al.*, 2001), pensamos que GCN2 podría ser también una diana de esta proteasa,

teniendo en cuenta que la activación de GCN2 durante la infección podría dificultar la progresión del ciclo viral. Para demostrarlo, se infectaron células MT-2 con VIH-1_{NL4.3} en ausencia o presencia de diferentes concentraciones del inhibidor específico de la proteasa de VIH-1 saquinavir (SQ) (**Figura R11A**).

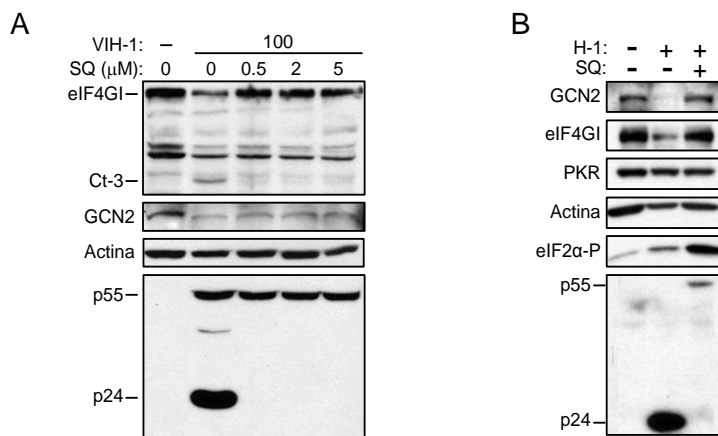


FIGURA R11: Degradación proteolítica de GCN2 en células infectadas con VIH-1 e inhibición de la proteólisis en presencia de saquinavir (SQ). (A) Células MT-2 fueron infectadas con VIH-1_{NL4.3} (100 ng de p24^{gag} por 10⁶ células) y se mantuvieron en presencia de diferentes concentraciones de SQ durante tres días después de la infección. (B) Células mononucleares de sangre periférica (PBMC), activadas previamente con fitohemaglutinina, fueron infectadas con VIH-1_{NL4.3} (100 ng de p24^{gag} por 10⁶ células), y se mantuvieron en ausencia o presencia de 0,5 μM saquinavir durante 4 días. Se analizó la cantidad de GCN2, la fosforilación de eIF2α y la expresión de otras proteínas celulares y virales mediante Western blot empleando anticuerpos específicos y fosfoespecíficos. Se muestra un experimento representativo de al menos tres con similares resultados.

Se puede observar que en las células infectadas en ausencia de SQ, tanto eIF4GI como GCN2 fueron degradados proteolíticamente; además, se puede apreciar que el polipéptido Gag fue procesado por la proteasa viral, dando lugar a varias proteínas virales, como es el caso de p24. Por otro lado, la presencia de SQ en el medio de cultivo, produjo la inhibición de la proteasa viral, el polipéptido Gag no se procesa, y no se produce el corte proteolítico sobre eIF4GI ni sobre GCN2.

Por otra parte, se infectaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) con VIH-1_{NL4.3}, en ausencia o presencia de SQ (**Figura R11B**). En las células infectadas que crecieron en ausencia de SQ, se observó la degradación del factor eIF4GI y de GCN2, y el procesamiento del polipéptido viral Gag, ya que la proteasa viral no se inhibe en esas condiciones. Además, en estas células también se produjo un ligero aumento de la fosforilación de eIF2α con respecto a las células no

infectadas. Por otro lado, las células infectadas que crecieron en presencia de SQ no experimentaron el corte proteolítico del factor eIF4GI o de GCN2, el virus no procesó el polipéptido Gag, y la fosforilación de eIF2 α fue superior a la observada en ausencia del inhibidor de la proteasa.

Todos estos datos indican que la proteasa de VIH-1 está implicada en la degradación proteolítica de GCN2 en células que han sido infectadas por el virus, evitando que la eIF2 α quinasa fosforile a su sustrato después de su activación.

3.2. LA PROTEASA DE VIH-1 DEGRADA PROTEOLÍTICAMENTE A GCN2 DE MANERA DIRECTA

3.2.1. La expresión de la proteasa de VIH-1 en células provoca la degradación de GCN2

Para profundizar en el estudio de la actividad proteolítica de VIH-1^{Pro} sobre GCN2, se expresó la proteasa viral mediante transfección transitoria en diferentes líneas celulares, de manera que podríamos estudiar el efecto de la proteasa sobre GCN2 en las células en ausencia de otras proteínas del virus, y se analizó la aparición de fragmentos de degradación de GCN2.

En primer lugar, se electroporaron células BHK-21 con distintos ARN, transcritos *in vitro*, del replicón del virus Sindbis, que permiten la expresión de la proteína de la cápsida (C) del virus y de la proteasa 2A del virus de la polio o de la proteasa del virus VIH-1 (**Figura R12B**). Después de mantener las células en cultivo durante cuatro horas, se analizó la expresión de las proteasas, y también su actividad sobre GCN2 y eIF4GI (**Figura R12A**). Primero, se puede comprobar que la expresión de la proteína C del virus Sindbis y de ambas proteasas se produjo de manera significativamente elevada con respecto a las proteínas celulares. Por otro lado, también se observó la generación de los correspondientes fragmentos de degradación del factor eIF4GI como consecuencia de la actividad de ambas proteasas, mientras que únicamente cuando se expresa VIH-1^{Pro} se produce el corte proteolítico de GCN2, con la aparición de un fragmento de degradación en torno a 130-140 kDa.

Por otra parte, se investigó la actividad de VIH-1^{Pro} sobre GCN2 coexpresando en células COS-7 la proteasa viral junto con GCN2 de ratón o de

humano (**Figura R12C**). De nuevo, la actividad proteolítica de VIH-1^{Pro} sobre GCN2 se puso de manifiesto con la aparición de un fragmento de degradación de GCN2 equivalente al que se observa en la figura R12A.

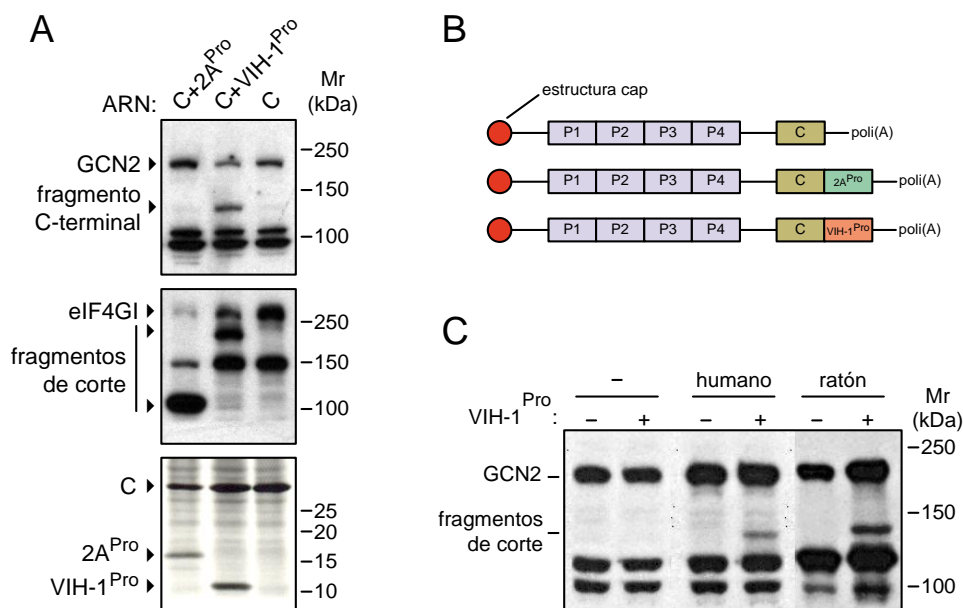


FIGURA R12: La expresión de la proteasa de VIH-1 en células degrada proteolíticamente a GCN2. (A) Células BHK-21 fueron electroporadas con distintos ARN transcritos *in vitro* del replicón del virus Sindbis, que permite la expresión de la proteína de la cápsida del virus (C), y de la proteasa 2A del virus de la polio (2A^{Pro}) o de la proteasa del virus VIH-1 (VIH-1^{Pro}). Se estudió mediante marcaje metabólico con [³⁵S]-Met/Cys la expresión de las proteasas (panel inferior), y también se analizó su actividad sobre GCN2 y eIF4GI mediante Western blot empleando anticuerpos específicos (paneles superiores). (B) Esquema que representa los ARN del replicón del virus Sindbis, utilizados para transfectar las células BHK-21 en la parte A de la figura; estos ARN presentan estructura cap (círculo rojo) y cola de poli-A (Castello *et al.*, 2006). (C) Células COS-7 fueron cotransfectadas con un plásmido derivado de pTM1 que codifica la proteasa de VIH-1 (VIH-1^{Pro}), y con plásmidos que codifican GCN2 de humano y de ratón. A su vez, las células fueron infectadas con el virus Vaccinia-T7 para expresar la polimerasa T7 y permitir la expresión de la proteasa, cuya secuencia está regulada por el promotor T7. La actividad de VIH-1^{Pro} se estudió mediante Western blot empleando un anticuerpo específico para detectar los posibles fragmentos de degradación de GCN2.

Estos resultados indican que en células que expresan la proteasa de VIH-1 en un contexto en el que no hay otras proteínas virales se produce la degradación proteolítica de la eIF2α quinasa GCN2, confirmando la hipótesis de que la proteasa actúa directamente sobre GCN2 llevando a cabo su degradación proteolítica.

3.2.2. La proteasa de VIH-1 degrada proteolíticamente a GCN2 *in vitro* y en extractos celulares

Para conocer si la proteasa de VIH-1 interviene de manera directa en la proteólisis de GCN2, se incubaron GCN2 de ratón y de humano, purificadas por afinidad, en presencia de VIH-1^{Pro} (**Figura R13A**). También se realizó el ensayo en presencia de la proteasa de VIH-2, ya que esta proteína también está implicada en la degradación proteolítica de proteínas que intervienen en el control de la traducción como eIF4GI y PABP (*Alvarez et al., 2006; Alvarez et al., 2003*). Se comprobó que ambas proteasas eran capaces de generar fragmentos de degradación tanto de GCN2 de humano como de ratón, y que el lugar de corte debía de ser el mismo o muy cercano, ya que el tamaño de los fragmentos resultó ser muy similar, en torno a 130-140 kDa.

Por otro lado, para extender estos resultados *in vitro* a un contexto en el que además de GCN2 se encontraran el resto de proteínas celulares, se añadió VIH-1^{Pro} recombinante a extractos citoplásmicos de células HeLa y se incubaron durante diferentes tiempos en ausencia o presencia de saquinavir para analizar la actividad de la proteasa (**Figura R13B**). En la imagen se observa que ya a los 15 minutos de incubación en ausencia de SQ no se detectó GCN2 completo, y que apareció el fragmento de degradación análogo al obtenido en el ensayo *in vitro* utilizando proteína purificada. Sin embargo, a pesar de que el factor eIF4GI fue cortado por la proteasa, una cantidad significativa de la proteína permaneció sin degradarse. PABP, otro sustrato celular de la proteasa, no pareció verse afectada significativamente por la actividad de la proteasa en estas condiciones de ensayo, observándose una ligera degradación. Por otra parte, la presencia de SQ inhibió la actividad de la proteasa, de manera que no se detectaron fragmentos de corte de GCN2 ni de eIF4GI.

Estos resultados indican que VIH-1^{Pro} desarrolla su actividad proteolítica de manera directa sobre GCN2, de modo que esta eIF2 α quinasa se suma a la lista de proteínas implicadas en el control de la traducción que son diana de la proteasa viral.

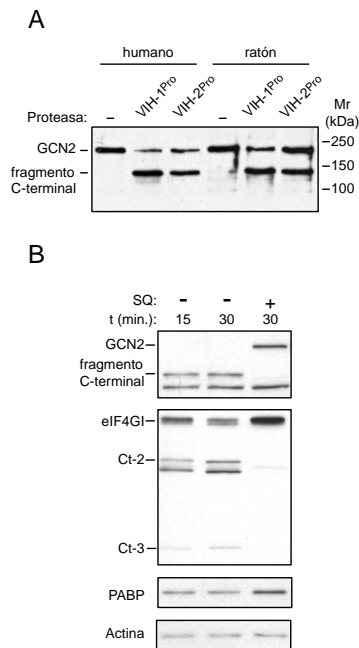


FIGURA R13: La proteasa de VIH-1 degrada de manera directa a GCN2. (A) GCN2 de ratón y de humano, purificadas por columna de afinidad TALONTM, se incubaron con VIH-1^{Pro} y con VIH-2^{Pro}, y se analizó la actividad de la proteasa sobre GCN2 detectando la generación de fragmentos de degradación mediante Western blot empleando un anticuerpo específico. (B) Extractos citoplásmicos de células HeLa fueron incubados con VIH-1^{Pro} recombinante durante diferentes tiempos en ausencia o presencia de 2,5 μ M saquinavir (SQ). Se estudió la actividad de VIH-1^{Pro} sobre GCN2, eIF4GI y PABP mediante Western blot empleando anticuerpos específicos.

3.2.3. Identificación del sitio de corte de VIH-1^{Pro} en GCN2

Después de comprobar que VIH-1^{Pro} degrada proteolíticamente a GCN2, nos propusimos identificar el sitio de corte. Para ello, se diseñaron plásmidos de expresión en bacterias que codificaran GCN2 de ratón y de humano truncadas y fusionadas a GST. El diseño de los plásmidos se hizo atendiendo al tamaño del fragmento de degradación principal obtenido como consecuencia de la actividad proteolítica de VIH-1^{Pro} sobre GCN2. En el caso de GCN2 de ratón, la secuencia de la proteína truncada comprende desde el aminoácido 419 hasta el 1024, mientras que para GCN2 de humano, desde el aminoácido 525 hasta el 1024. Las proteínas fusionadas a GST se expresaron en bacterias, se purificaron y se incubaron con VIH-1^{Pro} recombinante. El tratamiento con la proteasa generó un polipéptido principal de un peso molecular aparente de 67 kDa, tanto en el caso de la proteína de ratón como en la de humano (**Figura R14**), que contenía el extremo amino terminal del fragmento de GCN2 producido por la acción de VIH-1^{Pro}.

Estos fragmentos fueron secuenciados en su extremo amino terminal mediante el método de degradación de Edman, y las secuencias obtenidas fueron IETVIP, para la proteína de ratón, y VETVIP, en el caso de la proteína humana. De este modo, los sitios de corte de VIH-1^{Pro} se sitúan entre los residuos 560 y 561 en GCN2 de humano, y entre los residuos 559 y 560 en GCN2 de ratón.

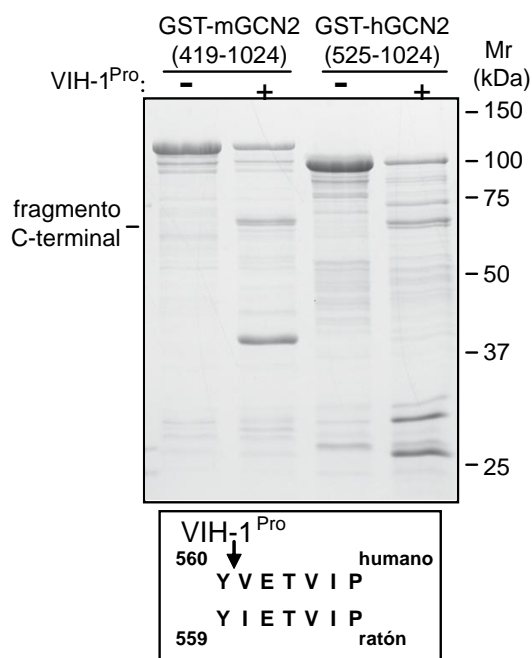


FIGURA R14: Identificación del sitio de corte de la proteasa de VIH-1 sobre GCN2. Fragmentos de GCN2 de humano (hGCN2) y de ratón (mGCN2), truncados (aminoácidos 525 a 1024, y 419 a 1024, respectivamente), y fusionados a GST, se purificaron y se incubaron con la proteasa de VIH-1 recombinante (VIH-1^{Pro}) durante tres horas. Las proteínas se separaron mediante electroforesis y se tiñeron con azul de Coomassie. Por otro lado, los fragmentos carboxilo terminal generados por la actividad de la proteasa, se secuenciaron mediante el método de degradación de Edman, de manera que se identificó el sitio de corte sobre GCN2 (parte inferior de la imagen).

3.3. LA DEGRADACIÓN PROTEOLÍTICA DE GCN2 POR LA PROTEASA DE VIH-1 REDUCE SIGNIFICATIVAMENTE LA ACTIVIDAD DE LA QUINASA IN VITRO

Una vez comprobado que GCN2 es sustrato de VIH-1^{Pro}, decidimos investigar si esta degradación de la quinasa modificaría de algún modo su actividad enzimática. Para ello, se incubó GCN2 de humano purificada en presencia de VIH-1^{Pro}, y después se realizó ensayo de actividad eIF2 α quinasa en presencia de ARN de VIH-1 (**Figura R15A**). Para tener certeza de que el efecto observado se debía a VIH-1^{Pro}, la incubación con la proteasa también se realizó en presencia del inhibidor SQ, añadido bien antes que VIH-1^{Pro} (carriles 4 y 5) o bien después de VIH-1^{Pro}, pero previo al ensayo de actividad (carril 6).

La incubación con VIH-1^{Pro} provocó la degradación de GCN2 y generó un fragmento que apenas se autofosforiló en presencia de ARN viral, y que fue incapaz de fosforilar a eIF2 α . Por otro lado, la presencia de SQ evitó el corte de GCN2, de modo que la autofosforilación de la quinasa fue prácticamente igual a la observada en ausencia de VIH-1^{Pro}, y eIF2 α se fosforiló como consecuencia de la activación de GCN2. De este modo, atendiendo a este resultado, la actividad proteolítica de VIH-1^{Pro} provoca la degradación de GCN2 y su inactivación.

Por otra parte, decidimos completar este estudio ensayando la actividad eIF2 α quinasa *in vitro* de dos polipéptidos equivalentes a los fragmentos obtenidos por la degradación proteolítica de GCN2 de humano por VIH-1^{Pro} (**Figura R15B**).

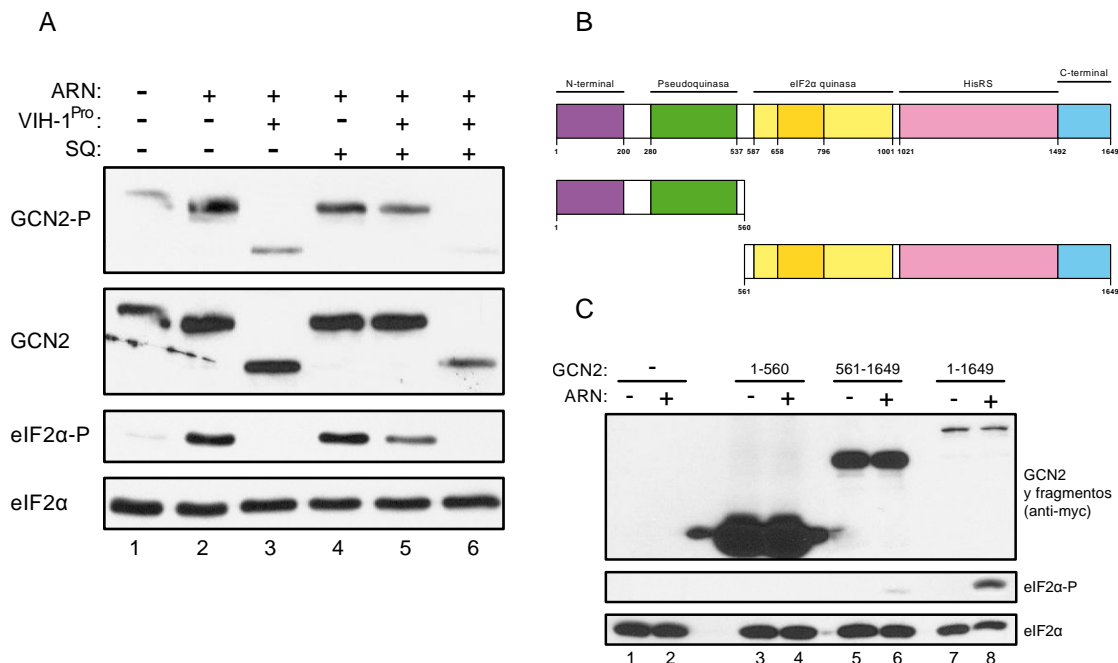


FIGURA R15: La actividad proteolítica de VIH-1^{Pro} inhibe la actividad eIF2 α quinasa de GCN2 *in vitro*. (A) GCN2 de humano expresada en células HEK 293 y purificada por columna de afinidad TALONTM, se incubó con VIH-1^{Pro} en ausencia o presencia de 2,5 μ M saquinavir (SQ), y posteriormente se realizó ensayo de actividad eIF2 α quinasa en presencia de ARN de VIH-1. En la muestra del carril número 6, el SQ se añadió después de incubar GCN2 con VIH-1^{Pro} e inmediatamente antes de comenzar el ensayo de actividad. (B) Representación esquemática que ilustra la estructura y dominios funcionales de GCN2 de humano, y de los fragmentos polipeptídicos diseñados equivalentes a los obtenidos por la degradación proteolítica de VIH-1^{Pro} sobre GCN2 (aminoácidos 1 a 560, y 561 a 1649). (C) Se realizó ensayo de actividad eIF2 α quinasa *in vitro* en presencia de ARN de VIH-1, con los polipéptidos purificados correspondientes a GCN2 de humano y a los fragmentos equivalentes a los obtenidos por la degradación proteolítica de VIH-1^{Pro} sobre GCN2, mostrados en la parte B. El resultado de A y C se analizó mediante Western blot empleando anticuerpos específicos y fosfoespecíficos dirigidos contra GCN2 y eIF2 α .

Los resultados obtenidos muestran que el fragmento amino terminal, que no contiene el dominio eIF2 α quinasa, fue incapaz de fosforilar al factor eIF2 en presencia de ARN viral, mientras que el fragmento carboxilo terminal, que contiene el dominio quinasa completo, apenas fosforiló al factor en comparación con la actividad de la quinasa completa (**Figura R15C**).

Estos resultados apoyan la idea de que la actividad proteolítica de VIH-1^{Pro} sobre GCN2 provoca la inactivación de la quinasa, de modo que es incapaz de responder a la activación por ARN viral fosforilando al factor eIF2.

4. ESTUDIO DE LA INHIBICIÓN DE LA RESPUESTA A ESTRÉS DEPENDIENTE DE eIF2 POR LA PROTEÍNA TAT

La eIF2 α quinasa PKR es uno de los componentes más importantes de la respuesta antiviral dependiente de interferón. En cultivos celulares infectados con VIH-1, la sobreexpresión de PKR provoca una potente inhibición de la expresión del genoma del virus y de la replicación viral (*Adelson et al., 1999; Dimitrova et al., 2005; Muto et al., 1999*). Sin embargo, como sucede con muchos otros virus, el virus VIH-1 ha desarrollado diferentes mecanismos de inhibición de la respuesta antiviral de PKR (*Clerzius et al., 2011*), entre los cuales se encuentra la inhibición mediada por la proteína Tat. Esta proteína es capaz de unirse a PKR, impidiendo la autofosforilación de la quinasa, y también actúa como un inhibidor competitivo, evitando la unión de PKR con el factor eIF2.

Por todo lo anterior, una vez demostrada la activación de GCN2 en respuesta a ARN de VIH-1, constituyendo esto un posible mecanismo antiviral celular, nos planteamos si la proteína Tat podría intervenir en algún mecanismo de inhibición de GCN2 similar al descrito para PKR.

4.1. EFECTO INHIBITORIO DE LA PROTEÍNA TAT SOBRE LA ACTIVIDAD DE GCN2 IN VITRO

En primer lugar, nos preguntamos si la proteína Tat es capaz de inhibir la activación de GCN2 *in vitro*. Para ello, abordamos esta cuestión realizando ensayo de actividad eIF2 α quinasa empleando GCN2 inmunoprecipitada, tanto la proteína silvestre como un mutante inactivo GCN2-K618R, en presencia de ARN viral, y en ausencia o presencia de la proteína Tat purificada (**Figura R16**).

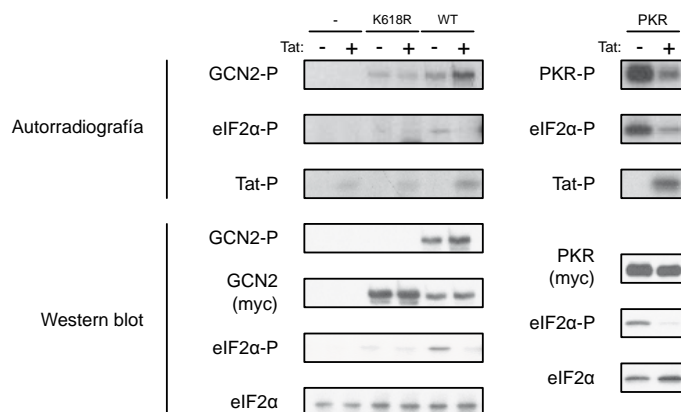


FIGURA R16: La proteína viral Tat provoca la inhibición de la fosforilación de eIF2α *in vitro*, pero incrementa la autofosforilación de GCN2. Se sobreexpresó GCN2 silvestre de humano (*wild type*, WT), un mutante inactivo GCN2-K618R (K618R) y PKR, etiquetadas con el epítipo myc, en células HeLa. Los lisados se incubaron con 5 µg de anticuerpo que reconoce específicamente el epítipo myc y con proteína G Sefarosa. Se realizó ensayo de actividad eIF2α quinasa con los inmunocomplejos obtenidos, en presencia de ARN viral, y en ausencia o presencia de la proteína Tat. En este ensayo se empleó [³²P]-γ-ATP para marcar radiativamente las proteínas fosforiladas durante el ensayo, cuya presencia se evidenció, tras separarlas en SDS-PAGE, mediante autorradiografía (panel superior). Además, se estudió también la fosforilación GCN2 y de eIF2α mediante Western blot, empleando anticuerpos específicos y fosfoespecíficos (panel inferior).

Los resultados obtenidos muestran que la fosforilación de eIF2α se inhibió completamente en presencia de la proteína Tat, del mismo modo que se observó para PKR. Por el contrario, la autofosforilación de GCN2 cuando Tat está presente en el ensayo fue superior a la que se observa en ausencia de la proteína viral, al contrario que para PKR, que disminuyó su fosforilación. Cuando se trata del mutante inactivo de GCN2, no se aprecia ninguna variación en el patrón de fosforilación. Por otro lado, en la autorradiografía se puede ver que la proteína Tat incrementó su fosforilación cuando el ensayo se realizó con GCN2 silvestre.

Para estudiar si el mecanismo de inhibición de PKR y GCN2 por Tat es un mecanismo de inhibición competitiva, nos planteamos que en ese caso Tat podría inhibir de un modo similar a las otras dos eIF2α quinasas (HRI y PERK), y que tal vez un exceso de cantidad de eIF2 podría reducir la inhibición de la fosforilación del factor por la proteína Tat. Por ello, se realizó ensayo de actividad eIF2α quinasa, en presencia de la proteína Tat, pero añadiendo un exceso de eIF2α recombinante de humano respecto a la cantidad empleada de eIF2 purificado de conejo. En esta

ocasión, se ensayaron las cuatro eIF2 α quinasas presentes en mamífero, purificadas por afinidad (**Figura R17**).

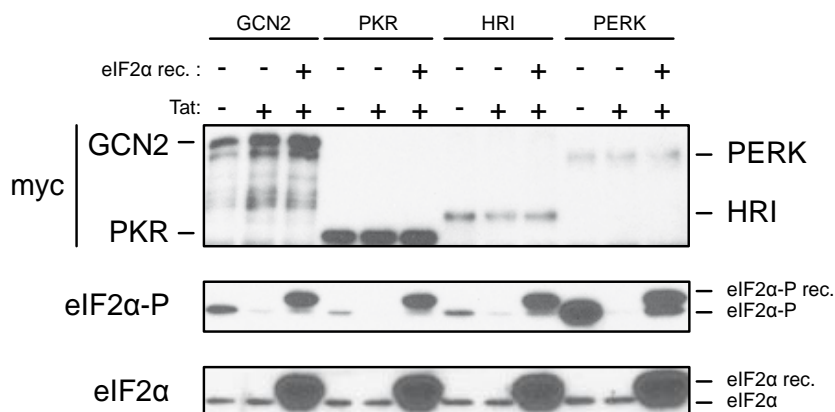


FIGURA R17: El mecanismo de inhibición de la fosforilación de eIF2 α llevado a cabo por la proteína Tat es de carácter competitivo. Se sobreexpresaron GCN2, PKR, HRI y PERK, etiquetadas con el epítipo myc, en células HeLa, y se purificaron mediante columna de afinidad TALONTM. Posteriormente, se ensayó su actividad eIF2 α quinasa *in vitro* en presencia de ARN de virus Sindbis, en ausencia o presencia de la proteína Tat, y con un exceso de cantidad o no de eIF2 α recombinante de humano. Se analizó el patrón de fosforilación de eIF2 α mediante Western blot empleando anticuerpos específicos y fosfoespecíficos.

Los resultados conseguidos indican que, en primer lugar, la actividad de las cuatro eIF2 α quinasas fue inhibida de forma similar por la presencia de la proteína Tat en el ensayo, y, en segundo lugar, que se redujo la inhibición de la fosforilación de eIF2 α cuando se aumentó la cantidad de factor eIF2 en el ensayo. De este modo, el mecanismo de inhibición de la fosforilación del factor eIF2 parece ser de carácter competitivo para las cuatro eIF2 α quinasas.

Después de comprobar que Tat disminuye la actividad de GCN2 *in vitro* mediante un mecanismo de inhibición competitiva, nos preguntamos si alguno de los dominios de la quinasa sería determinante para la inhibición de la actividad de GCN2 en presencia de la proteína viral. Para comprobar esta cuestión, se realizó ensayo de actividad eIF2 α quinasa *in vitro* con GCN2 tipo silvestre y varios mutantes puntuales y de delección, purificados por afinidad, en presencia de la proteína Tat (**Figura R18**).

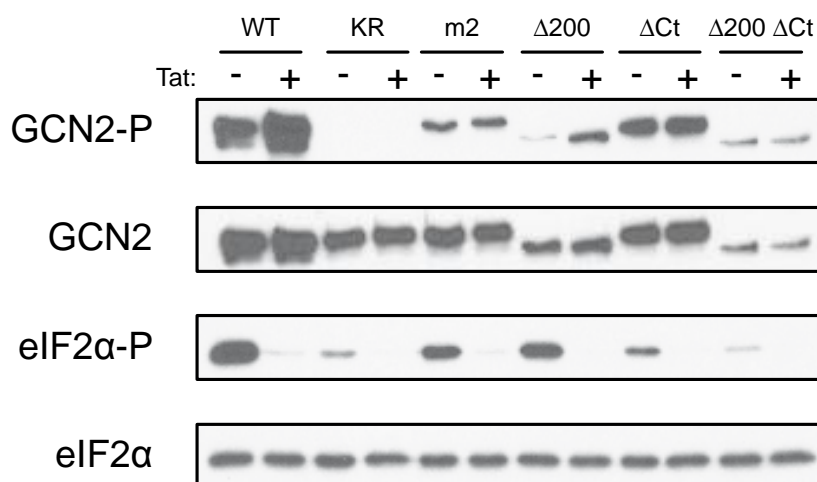


FIGURA R18: El mecanismo de inhibición de la fosforilación de eIF2α llevado a cabo por la proteína Tat afecta por igual a todos los mutantes de GCN2. Se sobreexpresaron GCN2 tipo silvestre (WT), los mutantes puntuales GCN2-K618R (KR) y GCN2-m2 (m2), y varios mutantes de delección, del extremo amino terminal (Δ200), del extremo carboxilo terminal (ΔCt), y de ambos extremos (Δ200 ΔCt) etiquetadas con el epítipo myc, en células HEK 293, y se purificaron mediante columna de afinidad TALON™. Posteriormente, se ensayó su actividad eIF2α quinasa *in vitro* en presencia de ARN viral, en ausencia o presencia de la proteína Tat, y se analizó el patrón de fosforilación de GCN2 y de eIF2α mediante Western blot empleando anticuerpos específicos y fosfoespecíficos.

Todos los mutantes ensayados mostraron una inhibición de la fosforilación de eIF2α en presencia de la proteína Tat, confirmando que el mecanismo llevado a cabo por la proteína viral es independiente de los dominios reguladores de GCN2.

Por otro lado, sólo GCN2 silvestre y el mutante de delección amino terminal incrementaron su propia fosforilación cuando la proteína Tat se encontraba presente en el ensayo.

4.2. EFECTO INHIBITORIO SOBRE LA ACTIVIDAD DE GCN2 EN CÉLULAS QUE EXPRESAN LA PROTEÍNA TAT

Los resultados obtenidos en los ensayos de actividad eIF2α quinasa *in vitro* nos hicieron plantearnos si se produciría el mismo efecto en líneas celulares que expresasen la proteína Tat y que fueran sometidas a algún tipo de estrés que provocara la activación de GCN2. De este modo, sobreexpresamos la proteína Tat en células HeLa empleando un plásmido que codifica Tat, etiquetada con el epítipo Ha. Posteriormente, se expuso a las células a luz UV y se analizó el efecto producido en ausencia y presencia de la proteína viral (**Figura R19**).

La exposición de las células a luz UV provocó la activación de GCN2 y la fosforilación de eIF2 α , siendo esta respuesta más significativa 2 horas después del tratamiento que a las 4 horas de recuperación.

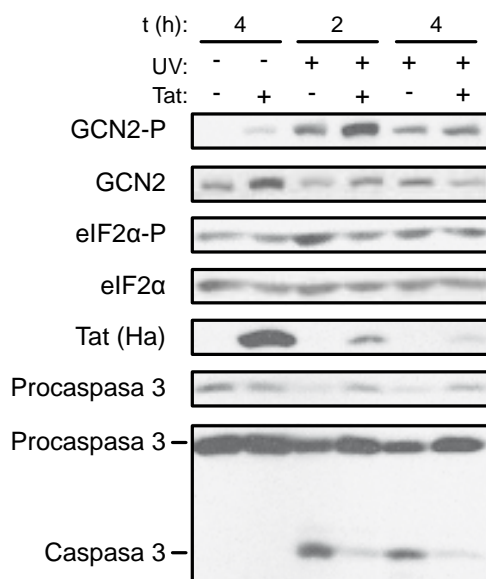


FIGURA R19: La sobreexpresión de la proteína Tat provoca un aumento de la activación de GCN2 y una disminución de la fosforilación de eIF2 α en células sometidas a luz UV. Células HeLa fueron electroporadas con un plásmido que codifica la secuencia completa de Tat etiquetada con el epítipo Ha, y se mantuvieron en cultivo durante 24 horas. Después, se expusieron a luz UV (120 mJ/cm²) y se dejaron recuperar a 37 °C durante el tiempo indicado. Se analizó el patrón de fosforilación de GCN2 y de eIF2 α , así como la expresión de la proteína Tat y la activación de la caspasa 3, mediante Western blot empleando anticuerpos específicos y fosfoespecíficos.

Por otro lado, la expresión de la proteína Tat se redujo significativamente en las células que fueron estresadas, probablemente como consecuencia de la regulación de la traducción dependiente de la fosforilación de eIF2 α en respuesta al estrés generado. No obstante, a pesar de esto, la fosforilación de GCN2 en las células estresadas que expresan Tat es superior que en las que no se expresa esta proteína. Este suceso se puede apreciar también incluso en las células que apenas expresan la proteína Tat. Además, parece que la fosforilación de eIF2 α se ve ligeramente reducida en las células estresadas que se han mantenido durante 2 horas de recuperación, y que expresan la proteína viral, respecto a aquellas que no la expresan. Por otro lado, la inducción de apoptosis como respuesta a la situación de estrés provocada, atendiendo a la activación de la caspasa 3, disminuye en las células que expresan la proteína Tat.

4.3. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LA PROTEÍNA TAT

Los resultados de inhibición de la fosforilación de eIF2 α obtenidos en células que expresan la proteína Tat fueron bastante discretos en comparación con los resultados de los ensayos de actividad eIF2 α quinasa *in vitro*. Por ello, nos preguntamos si la localización subcelular de Tat sería la causa, ya que esta proteína viral actúa como activador de la transcripción y, como tal, debería encontrarse mayoritariamente en el núcleo de la célula, por lo que quizás no podría interactuar con las eIF2 α quinasas, localizadas en el citoplasma.

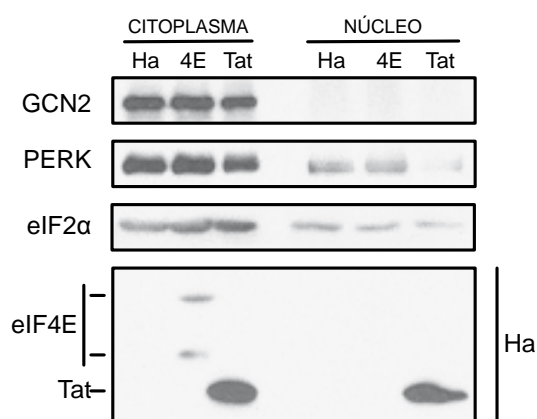


FIGURA R20: Tat sobreexpresada en células se encuentra tanto en la fracción citoplasmática como en la fracción nuclear. Se sobreexpresó la proteína Tat en células BHK-21 transfectando un plásmido que codifica Tat, etiquetada con el epítipo Ha. De manera análoga, se transfectó un plásmido que codifica el factor eIF4E etiquetado con el epítipo Ha, para utilizarlo como control. Los lisados celulares se fraccionaron por centrifugación diferencial, y se analizó mediante Western blot la presencia de diferentes proteínas celulares localizadas en el citoplasma (GCN2, PERK, eIF2 α) y las proteínas sobreexpresadas en las fracciones obtenidas utilizando anticuerpos específicos.

Para averiguar la localización subcelular de Tat en células que expresan esta proteína, se sobreexpresó Tat en células BHK-21 y se realizó un fraccionamiento subcelular mediante centrifugación diferencial de los lisados obtenidos. Se analizaron las fracciones que se corresponden con proteínas citoplásmicas y con proteínas nucleares, y se observó que Tat se encuentra en ambas fracciones de la célula en cantidades similares (**Figura R20**).

Por lo tanto, no parece que la localización subcelular de Tat sea la causa del menor efecto de esta proteína sobre la actividad eIF2 α quinasa de GCN2 en las células.

DISCUSIÓN

Todas las células tienen mecanismos de regulación que les permiten establecer las condiciones óptimas para su desarrollo. En situaciones de estrés, estas condiciones se ven alteradas y las células activan diferentes mecanismos de supervivencia en respuesta a todo tipo de agresiones externas e internas.

La traducción es uno de los principales procesos celulares regulados en situaciones de estrés. Se trata de un conjunto de reacciones biosintéticas que requiere elevadas cantidades de energía, por lo que precisa modificaciones que conduzcan a un ahorro energético. Además, la regulación de la traducción se encuentra implicada en la activación de respuestas apropiadas para superar las diferentes situaciones de estrés celular.

Las eIF2 α quinasas son proteínas que regulan la traducción en células eucariotas mediante la fosforilación del factor eIF2 durante situaciones de estrés celular (*de Haro et al., 1996*), provocando la inhibición generalizada de la síntesis de proteínas y la activación de la traducción de determinados ARNm que codifican factores celulares implicados en la respuesta a estrés (*Dever et al., 1992; Harding et al., 2000; Jackson et al., 2010*).

La eIF2 α quinasa GCN2 es una proteína conservada en células eucariotas desde levaduras hasta mamíferos. En células de mamífero se activa en respuesta a privación de aminoácidos, a luz UV (*Deng et al., 2002; Hinnebusch, 2005*) y a ARN viral (*Berlanga et al., 2006*). Así, teniendo en cuenta estos antecedentes y que otra eIF2 α quinasa, PKR, interviene en la respuesta antiviral dependiente de interferón en vertebrados, nos planteamos si GCN2 podría activarse en respuesta al ARN del virus VIH-1 y regular la traducción del ARNm viral.

Por otro lado, a pesar de la activación de PKR en respuesta a ARN de VIH-1 (*Adelson et al., 1999; Benkirane et al., 1997; Clerzius et al., 2009; Daher et al., 2001; Dimitrova et al., 2005; Muto et al., 1999*), existen diferentes mecanismos, virales y celulares, que inhiben esta respuesta, evitando el control de la replicación del virus (*Clerzius et al., 2011*). Por todo ello, también nos preguntamos si los mecanismos de inhibición de PKR en respuesta a ARN de VIH-1 afectarían del mismo modo a la activación de GCN2.

1. ESTUDIO DE LA ACTIVACIÓN DE LA *eIF2α* QUINASA GCN2 EN RESPUESTA A ARN DE VIH-1

La activación de la *eIF2α* quinasa PKR en respuesta a ARN de VIH-1 se debe a un dominio de reconocimiento de ARN de doble banda que se une a la secuencia TAR del virus. PKR también se activa *in vitro* en presencia de p(I)-p(C), un análogo sintético de ARNdc, que se emplea a menudo para activar a esta *eIF2α* quinasa. Además, se activa en presencia de ARN del virus Sindbis, mientras que ARNt deacilados no provocan una activación significativa de la quinasa (Berlango *et al.*, 2006).

Por otro lado, GCN2 posee un dominio HisRS a través del cual reconoce ARNt deacilados, provocando su activación (Wek *et al.*, 1995). La presencia de ARN del virus Sindbis también provoca su activación *in vitro*, pero no ocurre lo mismo con p(I)-p(C) (Berlango *et al.*, 2006).

De este modo, los antecedentes en relación con la activación de PKR y de GCN2 mediante su unión a diferentes tipos de ARN nos hicieron plantearnos si GCN2 podría activarse en respuesta a ARN de VIH-1.

Nuestros estudios han demostrado que la *eIF2α* quinasa GCN2 se activa *in vitro* en respuesta a ARN de VIH-1, y que este efecto es dependiente del motivo m2 del dominio HisRS. Estos resultados ponen de manifiesto que GCN2 podría comportarse en la célula como un sensor de ARN viral a través del cual se iniciaría una posible respuesta antiviral.

Una vez comprobada la activación de GCN2 en respuesta a ARN de VIH-1 *in vitro*, quisimos averiguar si esta misma situación se reproduciría en células en las que se expresa el ARNm de VIH-1. En primer lugar, hemos observado que se produce un incremento de la fosforilación de GCN2 a medida que aumenta la cantidad de ARNm viral expresado. Este hecho no demuestra directamente que sea la presencia de ARNm de VIH-1 la causa principal, pero no cabe duda de que la expresión del genoma del virus en la célula está provocando la activación de GCN2, estando estos resultados apoyados por los de la activación de la quinasa *in vitro*.

Sin embargo, el incremento de fosforilación de GCN2 no se corresponde con un aumento de la fosforilación de *eIF2α*. Este comportamiento podría explicarse por

varios motivos. En primer lugar, la información obtenida a través del Western blot se refiere a un momento puntual (24 horas después de la transfección) y no tiene por qué reflejar todo lo sucedido después de la activación de GCN2. La fosforilación de eIF2 α es un proceso altamente regulado, ya que existen dos complejos de fosfatasa que se encargan de desfosforilar al factor. Por un lado interviene un complejo constitutivo CReP/PP1c, que controla los niveles de fosforilación de eIF2 α de manera basal (*Jousse et al., 2003*); por otro lado, en situaciones de estrés celular, la fosforilación de eIF2 α activa la expresión de un segundo complejo de fosfatasa, GADD34/PP1c, que incrementa significativamente la desfosforilación de eIF2 α (*Brush et al., 2003; Novoa et al., 2001*), asegurando la recuperación de la síntesis de proteínas después de la respuesta a estrés (*Kojima et al., 2003; Novoa et al., 2003*). De este modo, la propia fosforilación de eIF2 α , y quizás otros sucesos desencadenados en respuesta a la expresión del genoma de VIH-1, provocan un incremento significativo de la cantidad de complejos de fosfatasa de eIF2 α en la célula, que reducen rápidamente los niveles de fosforilación de eIF2 α .

Por otro lado, se ha descrito que la proteína Tat es capaz de inhibir la actividad de PKR mediante su unión a la propia quinasa, actuando como un inhibidor competitivo, situándose en el lugar de unión de PKR con el factor eIF2 (*Brand et al., 1997; Cai et al., 2000*). Aunque no se ha analizado la expresión de la proteína Tat en las células que expresan el ARNm de VIH-1 no se puede descartar que este mecanismo de inhibición estuviera afectando el estado de fosforilación de eIF2 α . Quizás la cantidad de Tat en la célula sea lo suficientemente elevada como para provocar la inhibición de la actividad de GCN2, al igual que sucede con PKR, ya que el dominio catalítico es una región altamente conservada entre las eIF2 α quinasas. Pero además, la proteína Tat podría estar implicada en el proceso de desfosforilación de eIF2 α mediante la interacción con fosfatasa del grupo PP1 (*Ammosova et al., 2005*). Tat activa la transcripción de VIH-1 mediante el reclutamiento de diferentes coactivadores transcripcionales tales como el factor b de elongación transcripcional positiva, que contiene el grupo CDK9/ciclina T1 (*Herrmann and Rice, 1995; Yang et al., 1997; Zhu et al., 1997*), e histonas acetiltransferasas (*Deng et al., 2000; Herrmann and Rice, 1995; Ott et al., 1999*). Tat también se une a PP1, la transporta al núcleo y PP1 desfosforila a CDK9, contribuyendo a la regulación positiva de la transcripción de VIH-1 de manera crítica (*Bollen and Beullens, 2002*). De este modo,

quizás la proteína Tat se esté uniendo a subunidades reguladoras de la fosfatasa PP1 citoplasmáticas (CReP y GADD34), o únicamente a la subunidad catalítica del complejo, regulando su actividad e incrementando la desfosforilación de eIF2 α . Podría suceder también que la unión de Tat a GCN2, compitiendo con eIF2 α , estuviese aproximando las fosfatasas PP1 a complejos GCN2·eIF2 α -P cercanos, favoreciendo la desfosforilación de eIF2 α . Se ha descrito que la proteína ICP34.5 del virus herpes simple tipo 1 se encuentra estructuralmente relacionada con la subunidad reguladora GADD34 y es capaz de reclutar la subunidad catalítica PP1 e incrementar la desfosforilación de eIF2 α , eliminando la respuesta generada por la activación de PKR (He *et al.*, 1997, 1998) (**Figura D1**).

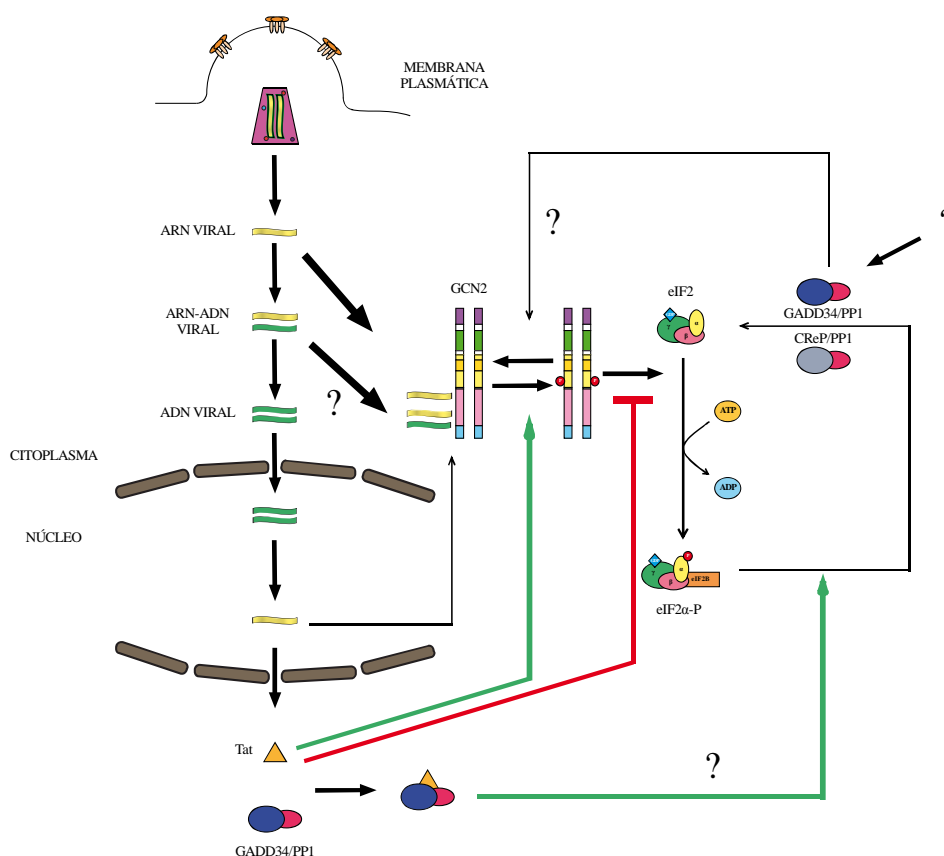


FIGURA D1: Regulación de la activación y de la actividad de GCN2 por ARN de VIH-1 y la proteína Tat. La presencia de ARN viral en el interior de la célula provoca la activación de GCN2, que fosforila a eIF2 α , inhibiendo de manera generalizada la traducción, aunque se incrementa la expresión de la fosfatasa GADD34/PP1, encargada de desfosforilar al factor y quizás también a GCN2. Por otro lado, la proteína Tat es capaz de inhibir de manera competitiva la fosforilación de eIF2 α mediante su unión con GCN2 y podría estar uniéndose a la fosfatasa del factor, incrementando su actividad y facilitando su unión a complejos GCN2·eIF2 α -P. Por otro lado, Tat aumenta la autofosforilación de GCN2, mediante su unión al dominio quinasa o a otro dominio de GCN2.

Nuestros resultados en relación con la activación de GCN2 en células que expresan el ARNm de VIH-1 nos muestran que en algunas líneas celulares acaba por producirse una caída en la fosforilación de GCN2. No se conocen datos acerca de la desfosforilación de GCN2 después de ser activada en respuesta a estrés, por lo que se desconoce el mecanismo de desactivación de la quinasa.

No obstante, la fosfatasa GADD34/PP1c podría estar implicada en la desfosforilación de GCN2, ya que los resultados obtenidos en células que sobreexpresan la subunidad reguladora de este complejo mostraron una menor fosforilación de la quinasa respecto a las células control. De este modo, el virus VIH-1 podría estar favoreciendo la actividad de la fosfatasa PP1 para reducir tanto la fosforilación de eIF2 α como de GCN2, aunque existiría cierta especificidad celular en este mecanismo de regulación.

Se ha descrito, sin embargo, que la activación de PKR en respuesta a ARN de VIH-1 es dependiente de la concentración de éste; mientras que bajas concentraciones de ARN viral provocan la activación de la quinasa, elevadas concentraciones causan el efecto contrario (*Carpick et al., 1997; Kim et al., 2006; Maitra et al., 1994*). Los resultados obtenidos en células que sobreexpresan el genoma de VIH-1 mostraron un efecto similar en relación con la fosforilación de GCN2 en las células BHK-21 y Jurkat, observándose una caída en la fosforilación de la quinasa en presencia de la mayor concentración de ADN transfectado. Sin embargo, no se produjo lo mismo en las otras líneas celulares estudiadas (HeLa y U87). Este resultado indica que el mecanismo de activación de GCN2 en respuesta a ARN de VIH-1 varía en función de la línea celular estudiada, pudiendo deberse a diferentes mecanismos de regulación o a la cantidad de GCN2 o de ARN viral expresado en cada tipo celular.

Por lo tanto, todo parece indicar que GCN2 se está activando en células que expresan ARNm de VIH-1, su estado de autofosforilación se mantiene, pero se dan lugar diferentes mecanismos, celulares y/o virales, dependientes del tipo celular, que parecen provocar la desfosforilación de eIF2 α .

Los resultados obtenidos en infección con VIH-1 nos permitieron comprobar que a tiempos tempranos y baja multiplicidad viral se produce la fosforilación de eIF2 α , mientras que después de varios días, este efecto disminuye drásticamente de

modo paralelo a la degradación de GCN2. Este hecho confirma la idea de que GCN2 se activa en respuesta a la infección por VIH-1, apoyando los resultados obtenidos en células en las que se sobreexpresa el genoma viral. Además, la desaparición de GCN2 a tiempos tardíos después de la infección sugiere que el virus ha desarrollado un mecanismo de degradación proteolítica, similar al descrito para el factor eIF4G (*Ventoso et al., 2001*), que le permitiría evadir la respuesta generada por GCN2.

Los resultados aportados por los experimentos realizados en diferentes líneas celulares, expresando el genoma de VIH-1 mediante el plásmido pNL4.3, podrían corresponder a lo que se observaría en etapas menos activas de la infección, ya que se trata de un sistema no replicativo y no se producen partículas virales. La eIF2 α quinasa GCN2 se activa en respuesta a ARN viral, probablemente fosforila al factor eIF2, y los mecanismos de desfosforilación ya comentados evitarían una respuesta más duradera. No se produce degradación de GCN2, a diferencia de lo que ocurre en las células infectadas, probablemente debido al carácter no replicativo del plásmido empleado. Por otro lado, el virus VIH-1_{NL4.3} utilizado en la infección, de ciclo rápido, permite situar a las células en un contexto de replicación activa, con niveles de expresión de la proteasa muy superiores a los observados en los experimentos de transfección. Probablemente, la activación de GCN2 en etapas más activas y avanzadas del ciclo del virus supone un inconveniente para la replicación del virus, el cual se ve beneficiado por la degradación de la quinasa.

2. ESTUDIO DE LA REGULACIÓN TRADUCCIONAL DE GCN2 SOBRE EL ARN DE VIH-1

Como ya se ha comentado en este trabajo, en células eucariotas, la síntesis de proteínas está principalmente regulada en la etapa de iniciación de la traducción del ARNm. En situaciones de estrés, las eIF2 α quinasas se activan, fosforilan al factor eIF2, provocan la inhibición generalizada de la traducción y activan la traducción de ARNm de factores implicados en la respuesta a estrés (*de Haro et al., 1996; Dever et al., 1992; Harding et al., 2000; Jackson et al., 2010*).

Los virus son parásitos intracelulares obligados que dependen de las células que infectan para poder realizar su ciclo de replicación, y puesto que carecen de la

maquinaria traduccional necesaria, necesitan que la traducción celular se encuentre activa.

Numerosos estudios indican que PKR desempeña un papel de gran importancia en la defensa antiviral mediada por interferón (*Balachandran et al., 2000; Stojdl et al., 2000*), aunque también se ha demostrado que esta quinasa no es esencial en la respuesta antiviral innata en infección por algunos virus, tales como el virus de la encefalomiocarditis, el virus vaccinia, el virus Sindbis y el virus de la gripe (*Abraham et al., 1999; Yang et al., 1995*). De hecho, se ha descrito que la ausencia de GCN2 en ratones y en cultivos celulares aumenta la susceptibilidad de infección por el virus Sindbis, mientras que la sobreexpresión de esta quinasa en células bloquea la traducción temprana del ARN genómico de este virus (*Berlanga et al., 2006*), de modo que GCN2 parece estar implicada en la respuesta antiviral, pudiendo intervenir en la defensa antiviral de la célula en infecciones en las que PKR no lo hace, actuando ambas en distintas etapas de la infección, o incluso de manera sinérgica.

El estudio que hemos realizado revela que la traducción del ARNm de VHI-1 es dependiente de eIF2 y susceptible de ser regulada negativamente por la fosforilación de eIF2 α . Este resultado apoya la idea de que, aunque no se ha observado fosforilación significativa de eIF2 α en muchos de los experimentos realizados en células, en algún momento posterior a la transfección el factor se habría podido fosforilar, aunque diversos mecanismos celulares y virales podrían haber revertido y bloqueado este proceso.

Nuestros resultados también apoyan el importante papel de GCN2 en la regulación eIF2 α dependiente de la traducción del ARNm de VIH-1. La ausencia de esta quinasa en células provoca un significativo aumento de la traducción del ARNm del virus. Los datos obtenidos mediante sobreexpresión de la quinasa en células también indicaron que GCN2 regula negativamente la traducción del ARNm de VIH-1, aunque los resultados no fueron equivalentes a los conseguidos en células que no expresan la quinasa. Este hecho puede deberse a varios motivos: en primer lugar, en los experimentos con MEF GCN2 $-/-$ ninguna célula expresa GCN2, mientras que en los experimentos de sobreexpresión, todas las células tienen GCN2 endógeno y un porcentaje de ellas además expresa la quinasa tipo silvestre o la mutante; por otro

lado, la cotransfección de plásmidos que codifican GCN2 y el genoma de VIH-1 no asegura que la sobreexpresión de ambos se produzca en la misma célula en un 100%; además, la sobreexpresión de GCN2 tipo silvestre no necesariamente implica que todas las proteínas sintetizadas se activen; y otro factor a tener en cuenta es la posible dimerización del mutante inactivo de GCN2 con la proteína endógena, pudiendo intervenir en la activación de la quinasa. Por ello, sí podemos concluir que la sobreexpresión de GCN2 regula negativamente la traducción de ARNm de VIH-1, aunque existen diferentes aspectos, inherentes al método experimental, que complican el estudio y podrían estar diluyendo el efecto de la quinasa sobre la regulación de la traducción.

El mecanismo de iniciación de la traducción del ARNm genómico de VIH-1 ha sido objeto de intensos debates durante años. Actualmente, se acepta que el virus es capaz de emplear mecanismos cap- e IRES dependientes en función del contexto celular en que se encuentre. De hecho, está descrito que la infección por VIH-1 se encuentra asociada con modificaciones de la homeostasis celular. Por ejemplo, la expresión de la proteína viral Vpr favorece la parada del ciclo celular en la fase G₂/M (*Zhao et al., 2011*), que está asociada con una disminución de la iniciación cap dependiente de la traducción. También se conoce que la infección por VIH-1 causa estrés oxidativo y en el retículo endoplásmico (*Deshmane et al., 2009; Lindl et al., 2007; Peruzzi, 2006; Pyo et al., 2008*), y estas situaciones podrían influir en la actividad de los elementos IRES del virus. Además, la proteasa del virus, necesaria para el procesamiento de los polipéptidos virales, tiene varias dianas celulares tales como eIF4G, PABP y eIF3d (*Alvarez et al., 2006; Jager et al., 2012; Ventoso et al., 2001*), de modo que se provocaría la inhibición de la traducción cap dependiente.

Recientemente se han publicado datos acerca de la regulación positiva que ejerce ATF4 sobre la replicación de VIH-1. El efecto transactivador de este factor de transcripción puede darse de manera directa o mediante colaboración con la proteína viral Tat dependiendo del tipo celular, pudiendo incluso reactivar el ciclo del virus en células infectadas de manera crónica (*Caselli et al., 2012*). Se sabe que proteínas del grupo ATF/CREB se unen a la región LTR de VIH-1 en regiones anteriores y posteriores al sitio de inicio transcripcional y regulan la expresión del virus (*Canonne-Hergaux et al., 1995; Rabbi et al., 1997; Roebuck et al., 1993; Van Lint et al., 1997*). Además, ATF4 puede formar heterodímeros con diferente especificidad

en la unión a ADN (*Caselli et al., 2003*). Esta relación entre ATF4 y VIH-1 complicaría más la respuesta creada por GCN2 mediante su activación por ARN del virus, ya que, si bien la fosforilación de eIF2 α provoca la inhibición generalizada de la traducción, también se produce un incremento de la traducción del ARNm de ATF4, que parece estar favoreciendo la replicación del virus. Además, las alteraciones homeostáticas creadas en células infectadas por VIH-1 activan respuestas a estrés eIF2 α dependientes, contribuyendo a aumentar más la expresión de ATF4.

Por lo tanto, nuestros resultados apoyan que GCN2 provoca la fosforilación de eIF2 α en respuesta a VIH-1 y que puede regular negativamente la traducción del ARNm del virus. No obstante, en un contexto de infección, con las variaciones homeostáticas celulares inducidas por la presencia del virus, la actividad de los elementos IRES, los mecanismos de evasión que pueda estar generando el virus, y la fase del ciclo biológico de VIH-1, serán más o menos decisivos la respuesta antiviral y el papel regulador del factor eIF2.

3. ESTUDIO DE LA DEGRADACIÓN PROTEOLÍTICA DE GCN2 POR LA PROTEASA DE VIH-1

Los virus necesitan la maquinaria traduccional de las células que infectan para sintetizar sus propias proteínas, ya que su genoma no codifica los componentes necesarios para ello. En ocasiones, los ARNm celular y viral compiten por la maquinaria traduccional, de modo que los virus han diseñado mecanismos que favorecen la síntesis de sus proteínas en detrimento de las proteínas de la célula.

Existe un elevado número de proteasas virales que intervienen en la proteólisis de varios componentes implicados en la iniciación de la traducción cap dependiente de la célula, tales como eIF4G y PABP (*Lloyd, 2006; Prevot et al., 2003*), y la proteasa de VIH-1 es una de ellas (*Castello et al., 2009; Ventoso et al., 2001*).

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la proteasa de VIH-1 también es responsable de la degradación de GCN2 en células infectadas con el virus y en células en las que se sobreexpresa la proteasa, así como en experimentos *in vitro*, utilizando la proteasa viral purificada.

La proteasa de VIH-1 es la enzima encargada de procesar los polipéptidos virales Gag y Gag-Pol para dar lugar a proteínas independientes. Este hecho es indicativo de formación de partículas virales y su liberación, es decir, un estado infectivo activo. En ese momento el virus necesita dirigir en gran medida la maquinaria traduccional celular en su propio beneficio, ya que la cantidad de proteínas virales sintetizadas es elevada. En esta situación, cualquier componente celular que pueda regular negativamente la traducción del ARNm de VIH-1 supone un inconveniente para su replicación, de modo que la eliminación de este tipo de proteínas celulares supone una ventaja para completar el ciclo del virus con éxito. Es el caso de GCN2, que regula negativamente la traducción del ARNm del virus y que es degradada proteolíticamente por VIH-1^{Pro}, de modo que su actividad se ve eliminada.

Los experimentos de infección de células con una cepa del virus de ciclo rápido mostraron claramente la elevada actividad proteolítica de VIH-1^{Pro} en etapas tardías de la infección, ya que no se observa polipéptido Gag sin procesar, mientras que las células que fueron transfectadas con el plásmido pNL4.3, de carácter no replicativo, no expresaron apenas la proteasa viral, de forma que no se produjo la degradación de GCN2.

Estos resultados podrían indicar que en etapas tempranas del ciclo del virus, cuando la proteína Tat desempeña un papel importante incrementando la transcripción del virus, se dan lugar mecanismos de inhibición de la respuesta antiviral de GCN2 en los que está implicada esta proteína viral. Por otro lado, en etapas más avanzadas del ciclo del virus, cuando se produce la expresión de proteínas estructurales y enzimáticas, entran en acción otros mecanismos de control de la respuesta antiviral, entre los que se encuentra la degradación proteolítica de varias proteínas celulares, llevada a cabo por VIH-1^{Pro}.

4. ESTUDIO DE LA INHIBICIÓN DE LA RESPUESTA A ESTRÉS DEPENDIENTE DE *eIF2* POR LA PROTEÍNA TAT

Estudios previos en relación con la proteína Tat y su efecto en la regulación de la actividad de la *eIF2*α quinasa PKR han determinado conclusiones contradictorias. Si bien, los trabajos *in vitro* parecen indicar que ambas proteínas se

unen, y que Tat es capaz de reducir tanto la activación de la quinasa como la fosforilación de eIF2 α (Brand *et al.*, 1997; Cai *et al.*, 2000; Clerzius *et al.*, 2011), se ha descrito también que la proteína Tat es responsable de la activación de PKR y de un aumento en la fosforilación de eIF2 α en células (Li *et al.*, 2005).

Nuestros resultados en el estudio del mecanismo de inhibición de Tat sobre la actividad de GCN2 *in vitro* han confirmado que la proteína Tat inhibe la fosforilación de eIF2 α *in vitro*, del mismo modo que se había descrito para PKR, y que esta inhibición es de carácter competitivo, ya que un aumento de la cantidad de eIF2 reduce el efecto inhibitorio. Por otro lado, al contrario de los datos existentes acerca del efecto de Tat sobre la actividad de PKR, hemos observado que GCN2 aumenta su fosforilación *in vitro* en presencia de Tat.

La diferencia observada en el comportamiento de GCN2 en los ensayos de actividad en presencia de Tat respecto a PKR es complicado de explicar con los datos obtenidos en este trabajo. Se ha descrito que Tat compite por el lugar de unión del factor eIF2 al dominio quinasa, pero no se conoce hasta el momento si esta proteína viral es capaz de unirse a otras regiones de ambas proteínas, como los dominios pseudoquinasa e HisRS de GCN2. De hecho, el estudio del mecanismo de inhibición de Tat sobre la actividad de GCN2 empleando mutantes de delección nos ha permitido comprobar que sólo la proteína silvestre y el mutante de delección amino terminal incrementan la autofosforilación en presencia de Tat, mientras que el mutante puntual m2 no tiene ese comportamiento. Este resultado podría indicar que el dominio HisRS interviene en el aumento de fosforilación por la unión a la proteína viral Tat. El mutante de delección del extremo carboxilo terminal tampoco incrementa su fosforilación, pudiendo deberse a que tenga toda su actividad autoquinasa desinhibida o a que este dominio también pueda estar implicado en este proceso.

En primer lugar, hay que recordar que no existe una homología completa en el dominio catalítico de ambas quinasas; a pesar de que comparten en gran medida la secuencia del dominio quinasa, parte de esta región, incluido el inserto, muestran grandes diferencias (Berlanga *et al.*, 1999). Además, se conocen algunas variaciones estructurales de los dominios catalíticos de GCN2 y PKR que podrían tener implicaciones en su regulación. Al igual que PKR, GCN2 es capaz de dimerizar, y esta estructura se estabiliza por interacciones entre diferentes dominios. Sin embargo,

GCN2 adquiere una distribución antiparalela en su dimerización, formando ambos monómeros un ángulo de 180°, a diferencia de la distribución paralela de PKR. En la estructura de PKR, la ausencia de un sustrato mantiene la región carboxilo terminal del dominio quinasa desorganizada, incluida la hélice α G del lugar de unión a eIF2 α (Dar *et al.*, 2005). Sin embargo, GCN2 puede adquirir la estructura organizada de PKR unido a eIF2 α de manera independiente al factor. Estas diferencias estructurales y de regulación podrían ser motivo de variabilidad en la respuesta a la unión a Tat (Dever *et al.*, 2007).

Por otro lado, se ha descrito que el dominio carboxilo terminal de GCN2 interviene en la autoinhibición de la quinasa en ausencia de estímulo. En levaduras, se conoce que este mecanismo depende de la interacción entre este extremo de la proteína y residuos situados en el dominio catalítico (Qiu *et al.*, 2001). Tat podría estar interfiriendo en las uniones de este dominio con otras regiones de la quinasa, evitando el efecto autoinhibitorio, mediante unión al propio dominio carboxilo o a otros dominios de GCN2.

El estudio realizado en cultivos celulares en relación con el efecto inhibitorio de Tat ha mostrado que, del mismo modo que sucede *in vitro*, se produce un aumento de la fosforilación de GCN2 en las células que han sido sometidas a estrés y que dicha fosforilación se ve favorecida por la presencia de Tat. Sin embargo, el patrón de fosforilación de eIF2 α en presencia de Tat difiere, ya que no se observa una reducción de la fosforilación de eIF2 α tan significativa como en los ensayos *in vitro*.

El análisis de la expresión de Tat mediante inmunodetección reveló una disminución muy drástica de la cantidad de Tat, probablemente por la inhibición generalizada de la traducción en respuesta al estrés provocado mediante luz UV. Este hecho, junto con la localización subcelular de Tat, distribuida de forma similar en el citoplasma y en el núcleo, pueden ser motivo de la discreta disminución de la fosforilación de eIF2 α , que no se encuentra en el núcleo de la célula. Sin embargo, a pesar de la reducida expresión de Tat, sí es capaz de llevar a cabo una actividad antiapoptótica en las células que han sido sometidas a estrés. Este efecto es típico de muchas infecciones virales, que evitan la muerte celular para poder aprovecharse de la maquinaria de la célula que han infectado.

El beneficio que pueda conseguir el virus mediante la fosforilación de GCN2 en respuesta a la proteína Tat es algo desconocido todavía. Quizás se trate de un efecto colateral debido a la unión de Tat, ya que, al menos *in vitro*, no tiene consecuencias positivas en la actividad de la quinasa sobre su sustrato eIF2 α . No obstante, hay que tener en cuenta que la proteína Tat provoca modificaciones en la fosforilación de las dos eIF2 α quinasas que pueden activarse en respuesta a infección viral, ya que PERK y HRI no mostraron alteraciones en el patrón de autofosforilación *in vitro*, de manera que el efecto observado en la autofosforilación de GCN2 y PKR probablemente sí tenga un significado biológico.

RESUMEN GENERAL

El estudio realizado en este trabajo nos ha permitido conocer el importante papel que posee la eIF2 α quinasa GCN2 en la regulación de la traducción del ARNm del virus de la inmunodeficiencia humana VIH-1. Esta quinasa actúa como sensor viral activándose en respuesta al ARN del virus, y genera una respuesta antiviral fosforilando al factor eIF2 e inhibiendo de manera generalizada la traducción en la célula. Estos resultados apoyan la importancia de la regulación dependiente de eIF2 sobre la replicación viral y ponen de manifiesto la actividad antiviral de GCN2 como un sistema protector celular alternativo a PKR.

Por otro lado, los resultados obtenidos nos han permitido conocer diferentes mecanismos de evasión del virus para combatir el efecto antiviral llevado a cabo por GCN2. En primer lugar, hemos descubierto la actividad de la proteasa de VIH-1 sobre GCN2, caracterizando el sitio de corte y comprobando que la degradación proteolítica llevada a cabo por VIH-1^{Pro} provoca la inactivación de la quinasa. Además, hemos estudiado el mecanismo de inhibición competitiva de la fosforilación del factor eIF2 en el que interviene la proteína Tat, y hemos comprobado que esta proteína viral bloquea la actividad de GCN2 *in vitro*.

En resumen, nuestros resultados nos han permitido identificar una nueva proteína celular implicada en la respuesta antiviral durante la infección por VIH-1 y también diferentes mecanismos virales dirigidos a contrarrestar su actividad. De este modo, se abre una línea de investigación dirigida a desarrollar terapias antivirales

generales o específicas empleando GCN2 y la modulación de su actividad como diana.

PERSPECTIVAS

Este trabajo ha permitido responder a diferentes cuestiones planteadas pero también han surgido nuevas interrogantes que dejan abiertas posibles futuras investigaciones.

En primer lugar, sería interesante definir el momento en el que se produce la fosforilación de eIF2 α como respuesta a ARN de VIH-1 y cuándo entran en funcionamiento los diferentes mecanismos de inhibición virales. Se ha propuesto la hipótesis de la unión de la proteína Tat con la fosfatasa PP1 como mecanismo de evasión de la fosforilación de eIF2 α , por lo que el estudio de la posible interacción entre estas dos proteínas podría abordarse en un futuro proyecto.

Se ha publicado recientemente que ATF4 regula positivamente la replicación de VIH-1, y este factor interviene en la respuesta generada por las eIF2 α quinasas, de modo que habría que caracterizar esta relación sinérgica para comprobar si se trata de otro mecanismo de evasión viral desarrollado por el virus VIH-1.

También se ha descrito el efecto positivo de diferentes situaciones de estrés en la actividad IRES de VIH-1, de modo que habría que dilucidar cuál es el papel del factor eIF2 en estas condiciones.

Un aspecto muy interesante descubierto con nuestros resultados es el incremento de fosforilación de GCN2 provocado por Tat. Sería interesante caracterizar los lugares de unión de Tat a GCN2 y qué regiones de la proteína viral intervienen en este proceso. Este aspecto tiene muchas preguntas sin responder, ya que se desconoce la manera en que Tat causa este efecto y cuál sería el posible significado biológico, ya que incrementar la autofosforilación de la quinasa e inhibir su actividad parecen aspectos contradictorios.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La eIF2 α quinasa GCN2 se activa en respuesta a ARN de VIH-1 *in vitro*, y en células infectadas con el virus o que expresan el genoma viral. Esta activación provoca la fosforilación del factor eIF2 y es dependiente del dominio HisRS.
2. GCN2 regula negativamente la síntesis de proteínas de VIH-1, de forma dependiente de la fosforilación del factor eIF2, en células que expresan el genoma del virus.
3. GCN2 es degradada proteolíticamente en células infectadas con VIH-1 y en células que expresan la proteasa del virus.
4. La proteasa de VIH-1 degrada proteolíticamente a GCN2 *in vitro* y provoca la pérdida de la actividad de la quinasa.
5. La proteína Tat de VIH-1 incrementa la fosforilación de GCN2 *in vitro* y en células que la sobreexpresan.
6. La proteína Tat inhibe de manera competitiva la fosforilación del factor eIF2 por GCN2 *in vitro*, siendo Tat sustrato de la eIF2 α quinasa.

BIBLIOGRAFÍA

A

- Abraham, N., Stojdl, D.F., Duncan, P.I., Methot, N., Ishii, T., Dube, M., Vanderhyden, B.C., Atkins, H.L., Gray, D.A., McBurney, M.W., et al. (1999). Characterization of transgenic mice with targeted disruption of the catalytic domain of the double-stranded RNA-dependent protein kinase, PKR. *J Biol Chem* 274, 5953-5962.
- Adelson, M.E., Martinand-Mari, C., Iacono, K.T., Muto, N.F., and Suhadolnik, R.J. (1999). Inhibition of human immunodeficiency virus (HIV-1) replication in SupT1 cells transduced with an HIV-1 LTR-driven PKR cDNA construct. *Eur J Biochem* 264, 806-815.
- Aldabe, R., Feduchi, E., Novoa, I., and Carrasco, L. (1995). Efficient cleavage of p220 by poliovirus 2Apro expression in mammalian cells: effects on vaccinia virus. *Biochem Biophys Res Commun* 215, 928-936.
- Alvarez, E., Castello, A., Menendez-Arias, L., and Carrasco, L. (2006). HIV protease cleaves poly(A)-binding protein. *Biochem J* 396, 219-226.
- Alvarez, E., Menendez-Arias, L., and Carrasco, L. (2003). The eukaryotic translation initiation factor 4GI is cleaved by different retroviral proteases. *J Virol* 77, 12392-12400.
- Ambrosino, C., Palmieri, C., Puca, A., Trimboli, F., Schiavone, M., Olimpico, F., Ruocco, M.R., di Leva, F., Toriello, M., Quinto, I., et al. (2002). Physical and functional interaction of HIV-1 Tat with E2F-4, a transcriptional regulator of mammalian cell cycle. *J Biol Chem* 277, 31448-31458.
- Ammosova, T., Jerebtsova, M., Beullens, M., Lesage, B., Jackson, A., Kashanchi, F., Southerland, W., Gordeuk, V.R., Bollen, M., and Nekhai, S. (2005). Nuclear targeting of protein phosphatase-1 by HIV-1 Tat protein. *J Biol Chem* 280, 36364-36371.
- Anderson, J.L., and Hope, T.J. (2003). Recent Insights into HIV Accessory Proteins. *Curr Infect Dis Rep* 5, 439-450.
- Asano, K., Clayton, J., Shalev, A., and Hinnebusch, A.G. (2000). A multifactor complex of eukaryotic initiation factors, eIF1, eIF2, eIF3, eIF5, and initiator tRNA(Met) is an important translation initiation intermediate in vivo. *Genes Dev* 14, 2534-2546.

- Asano, K., Krishnamoorthy, T., Phan, L., Pavitt, G.D., and Hinnebusch, A.G. (1999). Conserved bipartite motifs in yeast eIF5 and eIF2Bepsilon, GTPase-activating and GDP-GTP exchange factors in translation initiation, mediate binding to their common substrate eIF2. *EMBO J* 18, 1673-1688.

B

- Balachandran, S., Roberts, P.C., Brown, L.E., Truong, H., Pattnaik, A.K., Archer, D.R., and Barber, G.N. (2000). Essential role for the dsRNA-dependent protein kinase PKR in innate immunity to viral infection. *Immunity* 13, 129-141.
- Barre-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., et al. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220, 868-871.
- Battisti, P.L., Daher, A., Bannwarth, S., Voortman, J., Peden, K.W., Hiscott, J., Mouland, A.J., Benarous, R., and Gatignol, A. (2003). Additive activity between the trans-activation response RNA-binding protein, TRBP2, and cyclin T1 on HIV type 1 expression and viral production in murine cells. *AIDS Res Hum Retroviruses* 19, 767-778.
- Bayer, P., Kraft, M., Ejchart, A., Westendorp, M., Frank, R., and Rosch, P. (1995). Structural studies of HIV-1 Tat protein. *J Mol Biol* 247, 529-535.
- Ben Haij, N., Planes, R., Mzoughi, O. and Bahraoui, E. (2011). HIV infection “HIV Tat protein, a key factor in pathogenesis and immune system dysregulation: implication of IL-10”. In "HIV-Host Interactions", T.L. Chang, eds. InTech, pp. 25-60.
- Benkirane, M., Neuveut, C., Chun, R.F., Smith, S.M., Samuel, C.E., Gatignol, A., and Jeang, K.T. (1997). Oncogenic potential of TAR RNA binding protein TRBP and its regulatory interaction with RNA-dependent protein kinase PKR. *EMBO J* 16, 611-624.
- Berkhout, B., and Jeang, K.T. (1992). Functional roles for the TATA promoter and enhancers in basal and Tat-induced expression of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat. *J Virol* 66, 139-149.

- Berlanga, J.J., Herrero, S., and de Haro, C. (1998). Characterization of the hemin-sensitive eukaryotic initiation factor 2alpha kinase from mouse nonerythroid cells. *J Biol Chem* 273, 32340-32346.
- Berlanga, J.J., Rivero, D., Martin, R., Herrero, S., Moreno, S., and de Haro, C. (2010). Role of mitogen-activated protein kinase Sty1 in regulation of eukaryotic initiation factor 2alpha kinases in response to environmental stress in *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot Cell* 9, 194-207.
- Berlanga, J.J., Santoyo, J., and De Haro, C. (1999). Characterization of a mammalian homolog of the GCN2 eukaryotic initiation factor 2alpha kinase. *Eur J Biochem* 265, 754-762.
- Berlanga, J.J., Ventoso, I., Harding, H.P., Deng, J., Ron, D., Sonenberg, N., Carrasco, L., and de Haro, C. (2006). Antiviral effect of the mammalian translation initiation factor 2alpha kinase GCN2 against RNA viruses. *EMBO J* 25, 1730-1740.
- Bernstein, H.B., Tucker, S.P., Kar, S.R., McPherson, S.A., McPherson, D.T., Dubay, J.W., Lebowitz, J., Compans, R.W., and Hunter, E. (1995). Oligomerization of the hydrophobic heptad repeat of gp41. *J Virol* 69, 2745-2750.
- Berset, C., Zurbriggen, A., Djafarzadeh, S., Altmann, M., and Trachsel, H. (2003). RNA-binding activity of translation initiation factor eIF4G1 from *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* 9, 871-880.
- Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L.M., Harding, H.P., and Ron, D. (2000). Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* 2, 326-332.
- Bharucha, D.C., Zhou, M., Nekhai, S., Brady, J.N., Shukla, R.R., and Kumar, A. (2002). A protein phosphatase from human T cells augments tat transactivation of the human immunodeficiency virus type 1 long-terminal repeat. *Virology* 296, 6-16.
- Blair, E.D., Roberts, C.M., Snowden, B.W., Gatignol, A., Benkirane, M., and Jeang, K.T. (1995). Expression of TAR RNA-Binding Protein in Baculovirus and Co-Immunoprecipitation with Insect Cell Protein Kinase. *J Biomed Sci* 2, 322-329.
- Bollen, M., and Beullens, M. (2002). Signaling by protein phosphatases in the nucleus. *Trends Cell Biol* 12, 138-145.

- Bour, S., Geleziunas, R., and Wainberg, M.A. (1995). The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) CD4 receptor and its central role in promotion of HIV-1 infection. *Microbiol Rev* 59, 63-93.
- Brand, S.R., Kobayashi, R., and Mathews, M.B. (1997). The Tat protein of human immunodeficiency virus type 1 is a substrate and inhibitor of the interferon-induced, virally activated protein kinase, PKR. *J Biol Chem* 272, 8388-8395.
- Brasey, A., Lopez-Lastra, M., Ohlmann, T., Beerens, N., Berkhout, B., Darlix, J.L., and Sonenberg, N. (2003). The leader of human immunodeficiency virus type 1 genomic RNA harbors an internal ribosome entry segment that is active during the G2/M phase of the cell cycle. *J Virol* 77, 3939-3949.
- Brush, M.H., Weiser, D.C., and Shenolikar, S. (2003). Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD34 targets protein phosphatase 1 alpha to the endoplasmic reticulum and promotes dephosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2. *Mol Cell Biol* 23, 1292-1303.
- Buck, C.B., Shen, X., Egan, M.A., Pierson, T.C., Walker, C.M., and Siliciano, R.F. (2001). The human immunodeficiency virus type 1 gag gene encodes an internal ribosome entry site. *J Virol* 75, 181-191.
- Bushell, M., Wood, W., Clemens, M.J., and Morley, S.J. (2000). Changes in integrity and association of eukaryotic protein synthesis initiation factors during apoptosis. *Eur J Biochem* 267, 1083-1091.

C

- Cai, R., Carpick, B., Chun, R.F., Jeang, K.T., and Williams, B.R. (2000). HIV-1 TAT inhibits PKR activity by both RNA-dependent and RNA-independent mechanisms. *Arch Biochem Biophys* 373, 361-367.
- Callahan, M.A., Handley, M.A., Lee, Y.H., Talbot, K.J., Harper, J.W., and Panganiban, A.T. (1998). Functional interaction of human immunodeficiency virus type 1 Vpu and Gag with a novel member of the tetratricopeptide repeat protein family. *J Virol* 72, 8461.
- Canonne-Hergaux, F., Aunis, D., and Schaeffer, E. (1995). Interactions of the transcription factor AP-1 with the long terminal repeat of different human immunodeficiency virus type 1 strains in Jurkat, glial, and neuronal cells. *J Virol* 69, 6634-6642.

- Capon, D.J., and Ward, R.H. (1991). The CD4-gp120 interaction and AIDS pathogenesis. *Annu Rev Immunol* 9, 649-678.
- Carpick, B.W., Graziano, V., Schneider, D., Maitra, R.K., Lee, X., and Williams, B.R. (1997). Characterization of the solution complex between the interferon-induced, double-stranded RNA-activated protein kinase and HIV-I trans-activating region RNA. *J Biol Chem* 272, 9510-9516.
- Caselli, E., Benedetti, S., Gentili, V., Grigolato, J., and Di Luca, D. (2012). Short communication: activating transcription factor 4 (ATF4) promotes HIV type 1 activation. *AIDS Res Hum Retroviruses* 28, 907-912.
- Caselli, E., Galvan, M., Santoni, F., Rotola, A., Caruso, A., Cassai, E., and Luca, D.D. (2003). Human herpesvirus-8 (Kaposi's sarcoma-associated virus) ORF50 increases in vitro cell susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Gen Virol* 84, 1123-1131.
- Castello, A., Franco, D., Moral-Lopez, P., Berlanga, J.J., Alvarez, E., Wimmer, E., and Carrasco, L. (2009). HIV- 1 protease inhibits Cap- and poly(A)-dependent translation upon eIF4GI and PABP cleavage. *PLoS One* 4, e7997.
- Castello, A., Sanz, M.A., Molina, S., and Carrasco, L. (2006). Translation of Sindbis virus 26S mRNA does not require intact eukaryotic initiation factor 4G. *J Mol Biol* 355, 942-956.
- Chambers, P., Pringle, C.R., and Easton, A.J. (1990). Heptad repeat sequences are located adjacent to hydrophobic regions in several types of virus fusion glycoproteins. *J Gen Virol* 71 (Pt 12), 3075-3080.
- Chan, D.C., Fass, D., Berger, J.M., and Kim, P.S. (1997). Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* 89, 263-273.
- Chermann, J.C., Barre-Sinoussi, F., Dauguet, C., Brun-Vezinet, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W., and Montagnier, L. (1983). Isolation of a new retrovirus in a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome. *Antibiot Chemother* 32, 48-53.
- Cho, S., and Hoffman, D.W. (2002). Structure of the beta subunit of translation initiation factor 2 from the archaeon *Methanococcus jannaschii*: a representative of the eIF2beta/eIF5 family of proteins. *Biochemistry* 41, 5730-5742.
- Chonco, L., Pion, M., Vacas, E., Rasines, B., Maly, M., Serramia, M.J., Lopez-Fernandez, L., De la Mata, J., Alvarez, S., Gomez, R., et al. (2012). Carbosilane

dendrimer nanotechnology outlines of the broad HIV blocker profile. *J Control Release* 161, 949-958.

- Clavel, F., Guetard, D., Brun-Vezinet, F., Chamaret, S., Rey, M.A., Santos-Ferreira, M.O., Laurent, A.G., Dauguet, C., Katlama, C., Rouzioux, C., et al. (1986). Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* 233, 343-346.
- Clerzius, G., Gelinas, J.F., Daher, A., Bonnet, M., Meurs, E.F., and Gatignol, A. (2009). ADAR1 interacts with PKR during human immunodeficiency virus infection of lymphocytes and contributes to viral replication. *J Virol* 83, 10119-10128.
- Clerzius, G., Gelinas, J.F., and Gatignol, A. (2011). Multiple levels of PKR inhibition during HIV-1 replication. *Rev Med Virol* 21, 42-53.
- Connor, R.I., Chen, B.K., Choe, S., and Landau, N.R. (1995). Vpr is required for efficient replication of human immunodeficiency virus type-1 in mononuclear phagocytes. *Virology* 206, 935-944.

D

- Daher, A., Laraki, G., Singh, M., Melendez-Pena, C.E., Bannwarth, S., Peters, A.H., Meurs, E.F., Braun, R.E., Patel, R.C., and Gatignol, A. (2009). TRBP control of PACT-induced phosphorylation of protein kinase R is reversed by stress. *Mol Cell Biol* 29, 254-265.
- Daher, A., Longuet, M., Dorin, D., Bois, F., Segeral, E., Bannwarth, S., Battisti, P.L., Purcell, D.F., Benarous, R., Vaquero, C., et al. (2001). Two dimerization domains in the trans-activation response RNA-binding protein (TRBP) individually reverse the protein kinase R inhibition of HIV-1 long terminal repeat expression. *J Biol Chem* 276, 33899-33905.
- Dalgleish, A.G., Beverley, P.C., Clapham, P.R., Crawford, D.H., Greaves, M.F., and Weiss, R.A. (1984). The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 312, 763-767.
- Dar, A.C., Dever, T.E., and Sicheri, F. (2005). Higher-order substrate recognition of eIF2alpha by the RNA-dependent protein kinase PKR. *Cell* 122, 887-900.

- Das, S., and Maitra, U. (2000). Mutational analysis of mammalian translation initiation factor 5 (eIF5): role of interaction between the beta subunit of eIF2 and eIF5 in eIF5 function in vitro and in vivo. *Mol Cell Biol* 20, 3942-3950.
- de Haro, C., Mendez, R., and Santoyo, J. (1996). The eIF-2 α kinases and the control of protein synthesis. *FASEB J* 10, 1378-1387.
- Deacon, N.J., Tsykin, A., Solomon, A., Smith, K., Ludford-Menting, M., Hooker, D.J., McPhee, D.A., Greenway, A.L., Ellett, A., Chatfield, C., et al. (1995). Genomic structure of an attenuated quasi species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients. *Science* 270, 988-991.
- Deng, J., Harding, H.P., Raught, B., Gingras, A.C., Berlanga, J.J., Scheuner, D., Kaufman, R.J., Ron, D., and Sonenberg, N. (2002). Activation of GCN2 in UV-irradiated cells inhibits translation. *Curr Biol* 12, 1279-1286.
- Deng, L., de la Fuente, C., Fu, P., Wang, L., Donnelly, R., Wade, J.D., Lambert, P., Li, H., Lee, C.G., and Kashanchi, F. (2000). Acetylation of HIV-1 Tat by CBP/P300 increases transcription of integrated HIV-1 genome and enhances binding to core histones. *Virology* 277, 278-295.
- Deshmane, S.L., Mukerjee, R., Fan, S., Del Valle, L., Michiels, C., Sweet, T., Rom, I., Khalili, K., Rappaport, J., Amini, S., et al. (2009). Activation of the oxidative stress pathway by HIV-1 Vpr leads to induction of hypoxia-inducible factor 1 α expression. *J Biol Chem* 284, 11364-11373.
- Dever, T.E., Dar, A.C. and Sicheri, F. (2007). The eIF2 α kinases. In "Translational Control in Biology and Medicine", M. Mathews, N. Sonenberg and J.W.B. Hershey, eds. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 319-344.
- Dever, T.E., Feng, L., Wek, R.C., Cigan, A.M., Donahue, T.F., and Hinnebusch, A.G. (1992). Phosphorylation of initiation factor 2 α by protein kinase GCN2 mediates gene-specific translational control of GCN4 in yeast. *Cell* 68, 585-596.
- Dever, T.E., Yang, W., Astrom, S., Bystrom, A.S., and Hinnebusch, A.G. (1995). Modulation of tRNA(iMet), eIF-2, and eIF-2B expression shows that GCN4 translation is inversely coupled to the level of eIF-2.GTP.Met-tRNA(iMet) ternary complexes. *Mol Cell Biol* 15, 6351-6363.
- Dimitrova, D.I., Yang, X., Reichenbach, N.L., Karakasidis, S., Sutton, R.E., Henderson, E.E., Rogers, T.J., and Suhadolnik, R.J. (2005). Lentivirus-mediated

transduction of PKR into CD34(+) hematopoietic stem cells inhibits HIV-1 replication in differentiated T cell progeny. *J Interferon Cytokine Res* 25, 345-360.

- Dong, J., Qiu, H., Garcia-Barrio, M., Anderson, J., and Hinnebusch, A.G. (2000). Uncharged tRNA activates GCN2 by displacing the protein kinase moiety from a bipartite tRNA-binding domain. *Mol Cell* 6, 269-279.
- Dorin, D., Bonnet, M.C., Bannwarth, S., Gatignol, A., Meurs, E.F., and Vaquero, C. (2003). The TAR RNA-binding protein, TRBP, stimulates the expression of TAR-containing RNAs in vitro and in vivo independently of its ability to inhibit the dsRNA-dependent kinase PKR. *J Biol Chem* 278, 4440-4448.
- Doudna, J.A. and Sarnow, P. (2007). Translation initiation by viral internal ribosome entry sites. In "Translational Control in Biology and Medicine", M. Mathews, N. Sonenberg and J.W.B. Hershey, eds. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 129-153.
- Duarte, M., Graham, K., Daher, A., Battisti, P.L., Bannwarth, S., Segeral, E., Jeang, K.T., and Gatignol, A. (2000). Characterization of TRBP1 and TRBP2. Stable stem-loop structure at the 5' end of TRBP2 mRNA resembles HIV-1 TAR and is not found in its processed pseudogene. *J Biomed Sci* 7, 494-506.

E

- Elroy-Stein, O., Fuerst, T.R., and Moss, B. (1989). Cap-independent translation of mRNA conferred by encephalomyocarditis virus 5' sequence improves the performance of the vaccinia virus/bacteriophage T7 hybrid expression system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 6126-6130.
- Endo-Munoz, L., Warby, T., Harrich, D., and McMillan, N.A. (2005). Phosphorylation of HIV Tat by PKR increases interaction with TAR RNA and enhances transcription. *Virol J* 2, 17.

F

- Fauci, A.S. (1988). The human immunodeficiency virus: infectivity and mechanisms of pathogenesis. *Science* 239, 617-622.
- Foucault, M., Mayol, K., Receveur-Brechot, V., Bussat, M.C., Klinguer-Hamour, C., Verrier, B., Beck, A., Haser, R., Gouet, P., and Guillon, C. (2010). UV and X-

ray structural studies of a 101-residue long Tat protein from a HIV-1 primary isolate and of its mutated, detoxified, vaccine candidate. *Proteins* 78, 1441-1456.

G

- Garcia-Barrio, M., Dong, J., Ufano, S., and Hinnebusch, A.G. (2000). Association of GCN1-GCN20 regulatory complex with the N-terminus of eIF2alpha kinase GCN2 is required for GCN2 activation. *EMBO J* 19, 1887-1899.
- Garcia-Merino, I., de Las Cuevas, N., Jimenez, J.L., Gallego, J., Gomez, C., Prieto, C., Serramia, M.J., Lorente, R., and Munoz-Fernandez, M.A. (2009). The Spanish HIV BioBank: a model of cooperative HIV research. *Retrovirology* 6, 27.
- Gil, J., and Esteban, M. (2000). Induction of apoptosis by the dsRNA-dependent protein kinase (PKR): mechanism of action. *Apoptosis* 5, 107-114.
- Gkogkas, C., Sonenberg, N., and Costa-Mattioli, M. (2010). Translational control mechanisms in long-lasting synaptic plasticity and memory. *J Biol Chem* 285, 31913-31917.
- Gomez, E., Mohammad, S.S., and Pavitt, G.D. (2002). Characterization of the minimal catalytic domain within eIF2B: the guanine-nucleotide exchange factor for translation initiation. *EMBO J* 21, 5292-5301.
- Goncalves, J., Jallepalli, P., and Gabuzda, D.H. (1994). Subcellular localization of the Vif protein of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 68, 704-712.
- Gonzalez, M.E., and Carrasco, L. (1998). The human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein enhances membrane permeability. *Biochemistry* 37, 13710-13719.
- Gordon-Alonso, M., Sala-Valdes, M., Rocha-Perugini, V., Perez-Hernandez, D., Lopez-Martin, S., Ursa, A., Alvarez, S., Kolesnikova, T.V., Vazquez, J., Sanchez-Madrid, F., et al. (2012). EWI-2 association with alpha-actinin regulates T cell immune synapses and HIV viral infection. *J Immunol* 189, 689-700.
- Gottlinger, H.G., Sodroski, J.G., and Haseltine, W.A. (1989). Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 5781-5785.
- Gupta, V., Huang, X., and Patel, R.C. (2003). The carboxy-terminal, M3 motifs of PACT and TRBP have opposite effects on PKR activity. *Virology* 315, 283-291.

- Gutierrez, P., Osborne, M.J., Siddiqui, N., Trempe, J.F., Arrowsmith, C., and Gehring, K. (2004). Structure of the archaeal translation initiation factor aIF2 beta from *Methanobacterium thermoautotrophicum*: implications for translation initiation. *Protein Sci* 13, 659-667.

H

- Hanks, S.K., and Hunter, T. (1995). Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J* 9, 576-596.
- Harding, H.P., Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Wek, R., Schapira, M., and Ron, D. (2000). Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell* 6, 1099-1108.
- Harding, H.P., Zhang, Y., Zeng, H., Novoa, I., Lu, P.D., Calton, M., Sadri, N., Yun, C., Popko, B., Paules, R., et al. (2003). An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell* 11, 619-633.
- Harrich, D., Hooker, C.W., and Parry, E. (2000). The human immunodeficiency virus type 1 TAR RNA upper stem-loop plays distinct roles in reverse transcription and RNA packaging. *J Virol* 74, 5639-5646.
- He, B., Gross, M., and Roizman, B. (1997). The gamma(1)34.5 protein of herpes simplex virus 1 complexes with protein phosphatase 1alpha to dephosphorylate the alpha subunit of the eukaryotic translation initiation factor 2 and preclude the shutoff of protein synthesis by double-stranded RNA-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 843-848.
- He, B., Gross, M., and Roizman, B. (1998). The gamma134.5 protein of herpes simplex virus 1 has the structural and functional attributes of a protein phosphatase 1 regulatory subunit and is present in a high molecular weight complex with the enzyme in infected cells. *J Biol Chem* 273, 20737-20743.
- He, J., Choe, S., Walker, R., Di Marzio, P., Morgan, D.O., and Landau, N.R. (1995). Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R (Vpr) arrests cells in the G2 phase of the cell cycle by inhibiting p34cdc2 activity. *J Virol* 69, 6705-6711.

- Hellen, C.U., and Sarnow, P. (2001). Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes Dev* 15, 1593-1612.
- Herbreteau, C.H., Weill, L., Decimo, D., Prevot, D., Darlix, J.L., Sargueil, B., and Ohlmann, T. (2005). HIV-2 genomic RNA contains a novel type of IRES located downstream of its initiation codon. *Nat Struct Mol Biol* 12, 1001-1007.
- Herrero, S. (2000). Clonaje y caracterización de nuevas eIF2 α quinasas reguladas por hemina. Tesis doctoral. Departamento de Biología Molecular. Universidad Autónoma de Madrid.
- Herrmann, C.H., and Rice, A.P. (1995). Lentivirus Tat proteins specifically associate with a cellular protein kinase, TAK, that hyperphosphorylates the carboxyl-terminal domain of the large subunit of RNA polymerase II: candidate for a Tat cofactor. *J Virol* 69, 1612-1620.
- Hinnebusch, A.G. (1997). Translational regulation of yeast GCN4. A window on factors that control initiator-trna binding to the ribosome. *J Biol Chem* 272, 21661-21664.
- Hinnebusch, A.G. (2005). Translational regulation of GCN4 and the general amino acid control of yeast. *Annu Rev Microbiol* 59, 407-450.
- Hinnebusch, A.G. (2011). Molecular mechanism of scanning and start codon selection in eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev* 75, 434-467, first page of table of contents.
- Hinnebusch, A.G., Dever, T.E. and Asano, K. (2007). Mechanism of translation initiation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In "Translational Control in Biology and Medicine", M. Mathews, N. Sonenberg and J.W.B. Hershey, eds. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 225-268.
- Huang, X., Hutchins, B., and Patel, R.C. (2002). The C-terminal, third conserved motif of the protein activator PACT plays an essential role in the activation of double-stranded-RNA-dependent protein kinase (PKR). *Biochem J* 366, 175-186.
- Hunter, T., Hunt, T., Jackson, R.J., and Robertson, H.D. (1975). The characteristics of inhibition of protein synthesis by double-stranded ribonucleic acid in reticulocyte lysates. *J Biol Chem* 250, 409-417.

I

- Imataka, H., Gradi, A., and Sonenberg, N. (1998). A newly identified N-terminal amino acid sequence of human eIF4G binds poly(A)-binding protein and functions in poly(A)-dependent translation. *EMBO J* 17, 7480-7489.
- Ito, T., Yang, M., and May, W.S. (1999). RAX, a cellular activator for double-stranded RNA-dependent protein kinase during stress signaling. *J Biol Chem* 274, 15427-15432.

J

- Jackson, R.J. (2005). Alternative mechanisms of initiating translation of mammalian mRNAs. *Biochem Soc Trans* 33, 1231-1241.
- Jackson, R.J., Hellen, C.U., and Pestova, T.V. (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 113-127.
- Jager, S., Cimermancic, P., Gulbahce, N., Johnson, J.R., McGovern, K.E., Clarke, S.C., Shales, M., Mercenne, G., Pache, L., Li, K., et al. (2012). Global landscape of HIV-human protein complexes. *Nature* 481, 365-370.
- Johnson, L.N., Noble, M.E., and Owen, D.J. (1996). Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell* 85, 149-158.
- Johri, M.K., Mishra, R., Chhatbar, C., Unni, S.K., and Singh, S.K. (2011). Tits and bits of HIV Tat protein. *Expert Opin Biol Ther* 11, 269-283.
- Jonckheere, H., Anne, J., and De Clercq, E. (2000). The HIV-1 reverse transcription (RT) process as target for RT inhibitors. *Med Res Rev* 20, 129-154.
- Jousse, C., Oyadomari, S., Novoa, I., Lu, P., Zhang, Y., Harding, H.P., and Ron, D. (2003). Inhibition of a constitutive translation initiation factor 2alpha phosphatase, CReP, promotes survival of stressed cells. *J Cell Biol* 163, 767-775.

K

- Kapp, L.D., and Lorsch, J.R. (2004). GTP-dependent recognition of the methionine moiety on initiator tRNA by translation factor eIF2. *J Mol Biol* 335, 923-936.

- Karczewski, M.K., and Strebel, K. (1996). Cytoskeleton association and virion incorporation of the human immunodeficiency virus type 1 Vif protein. *J Virol* 70, 494-507.
- Karn, J. (1999). Tackling Tat. *J Mol Biol* 293, 235-254.
- Khaleghpour, K., Kahvejian, A., De Crescenzo, G., Roy, G., Svitkin, Y.V., Imataka, H., O'Connor-McCourt, M., and Sonenberg, N. (2001). Dual interactions of the translational repressor Paip2 with poly(A) binding protein. *Mol Cell Biol* 21, 5200-5213.
- Kim, I., Liu, C.W., and Puglisi, J.D. (2006). Specific recognition of HIV TAR RNA by the dsRNA binding domains (dsRBD1-dsRBD2) of PKR. *J Mol Biol* 358, 430-442.
- Kimball, S.R. (1999). Eukaryotic initiation factor eIF2. *Int J Biochem Cell Biol* 31, 25-29.
- Kojima, E., Takeuchi, A., Haneda, M., Yagi, A., Hasegawa, T., Yamaki, K., Takeda, K., Akira, S., Shimokata, K., and Isobe, K. (2003). The function of GADD34 is a recovery from a shutoff of protein synthesis induced by ER stress: elucidation by GADD34-deficient mice. *FASEB J* 17, 1573-1575.
- Kozak, M. (1989). The scanning model for translation: an update. *J Cell Biol* 108, 229-241.
- Kozak, M. (1991). An analysis of vertebrate mRNA sequences: intimations of translational control. *J Cell Biol* 115, 887-903.
- Kozak, S.L., Platt, E.J., Madani, N., Ferro, F.E., Jr., Peden, K., and Kabat, D. (1997). CD4, CXCR-4, and CCR-5 dependencies for infections by primary patient and laboratory-adapted isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 71, 873-882.
- Krishnamoorthy, T., Pavitt, G.D., Zhang, F., Dever, T.E., and Hinnebusch, A.G. (2001). Tight binding of the phosphorylated alpha subunit of initiation factor 2 (eIF2alpha) to the regulatory subunits of guanine nucleotide exchange factor eIF2B is required for inhibition of translation initiation. *Mol Cell Biol* 21, 5018-5030.

L

- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Laraki, G., Clerzius, G., Daher, A., Melendez-Pena, C., Daniels, S., and Gatignol, A. (2008). Interactions between the double-stranded RNA-binding proteins TRBP and PACT define the Medipal domain that mediates protein-protein interactions. *RNA Biol* 5, 92-103.
- Laurino, J.P., Thompson, G.M., Pacheco, E., and Castilho, B.A. (1999). The beta subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 binds mRNA through the lysine repeats and a region comprising the C2-C2 motif. *Mol Cell Biol* 19, 173-181.
- Levy, D.E., Marie, I., and Prakash, A. (2003). Ringing the interferon alarm: differential regulation of gene expression at the interface between innate and adaptive immunity. *Curr Opin Immunol* 15, 52-58.
- Li, J.C., Lee, D.C., Cheung, B.K., and Lau, A.S. (2005). Mechanisms for HIV Tat upregulation of IL-10 and other cytokine expression: kinase signaling and PKR-mediated immune response. *FEBS Lett* 579, 3055-3062.
- Li, Q., Smith, A.J., Schacker, T.W., Carlis, J.V., Duan, L., Reilly, C.S., and Haase, A.T. (2009). Microarray analysis of lymphatic tissue reveals stage-specific, gene expression signatures in HIV-1 infection. *J Immunol* 183, 1975-1982.
- Lindl, K.A., Akay, C., Wang, Y., White, M.G., and Jordan-Sciutto, K.L. (2007). Expression of the endoplasmic reticulum stress response marker, BiP, in the central nervous system of HIV-positive individuals. *Neuropathol Appl Neurobiol* 33, 658-669.
- Lloyd, R.E. (2006). Translational control by viral proteinases. *Virus Res* 119, 76-88.
- Lu, L., Han, A.P., and Chen, J.J. (2001). Translation initiation control by heme-regulated eukaryotic initiation factor 2 α kinase in erythroid cells under cytoplasmic stresses. *Mol Cell Biol* 21, 7971-7980.

M

- Ma, K., Vattem, K.M., and Wek, R.C. (2002). Dimerization and release of molecular chaperone inhibition facilitate activation of eukaryotic initiation factor-2 kinase in response to endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem* 277, 18728-18735.
- Maddon, P.J., Dagleish, A.G., McDougal, J.S., Clapham, P.R., Weiss, R.A., and Axel, R. (1986). The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell* 47, 333-348.
- Maitra, R.K., McMillan, N.A., Desai, S., McSwiggen, J., Hovanessian, A.G., Sen, G., Williams, B.R., and Silverman, R.H. (1994). HIV-1 TAR RNA has an intrinsic ability to activate interferon-inducible enzymes. *Virology* 204, 823-827.
- Manche, L., Green, S.R., Schmedt, C., and Mathews, M.B. (1992). Interactions between double-stranded RNA regulators and the protein kinase DAI. *Mol Cell Biol* 12, 5238-5248.
- Mangeat, B., Turelli, P., Caron, G., Friedli, M., Perrin, L., and Trono, D. (2003). Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature* 424, 99-103.
- Martín, R. (2012). Caracterización funcional de las eIF2alfa quinasas de *Schizosaccharomyces pombe* en distintas situaciones de estrés. Tesis Doctoral. Departamento de Biología Molecular. Universidad Autónoma de Madrid.
- Mathews, M.B., Sonenberg, N. and Hershey, J.W.B. (2007). Origins and principles in translation control. In "Translational Control in Biology and Medicine", M. Mathews, N. Sonenberg and J.W.B. Hershey, eds. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 1-40.
- McEwen, E., Kedersha, N., Song, B., Scheuner, D., Gilks, N., Han, A., Chen, J.J., Anderson, P., and Kaufman, R.J. (2005). Heme-regulated inhibitor kinase-mediated phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 inhibits translation, induces stress granule formation, and mediates survival upon arsenite exposure. *J Biol Chem* 280, 16925-16933.
- Medders, K.E., and Kaul, M. (2011). Mitogen-activated protein kinase p38 in HIV infection and associated brain injury. *J Neuroimmune Pharmacol* 6, 202-215.

- Miyoshi, I., Kubonishi, I., Yoshimoto, S., and Shiraishi, Y. (1981). A T-cell line derived from normal human cord leukocytes by co-culturing with human leukemic T-cells. *Gann* 72, 978-981.
- Mohr, I.J., Pe'ery, T. and Mathews, M.B. (2007). Protein synthesis and translational control during viral infection. In "Translational Control in Biology and Medicine", M. Mathews, N. Sonenberg and J.W.B. Hershey, eds. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 545-599.
- Muto, N.F., Martinand-Mari, C., Adelson, M.E., and Suhadolnik, R.J. (1999). Inhibition of replication of reactivated human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in latently infected U1 cells transduced with an HIV-1 long terminal repeat-driven PKR cDNA construct. *J Virol* 73, 9021-9028.

N

- Naryshkin, N.A., Gait, M.J., and Ivanovskaya, M.G. (1998). RNA recognition and regulation of HIV-1 gene expression by viral factor Tat. *Biochemistry (Mosc)* 63, 489-503.
- Nelson, D.L. and Cox, M.M. (2006). *Lehninger Principios de Bioquímica*. Cuarta edición. Ed. Omega. Barcelona. España.
- Nicholson, M.G., Rue, S.M., Clements, J.E., and Barber, S.A. (2006). An internal ribosome entry site promotes translation of a novel SIV Pr55(Gag) isoform. *Virology* 349, 325-334.
- Novoa, I., Zeng, H., Harding, H.P., and Ron, D. (2001). Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2 α . *J Cell Biol* 153, 1011-1022.
- Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Jungreis, R., Harding, H.P., and Ron, D. (2003). Stress-induced gene expression requires programmed recovery from translational repression. *EMBO J* 22, 1180-1187.

O

- Ohagen, A., and Gabuzda, D. (2000). Role of Vif in stability of the human immunodeficiency virus type 1 core. *J Virol* 74, 11055-11066.

- Olsen, H.S., and Rosen, C.A. (1992). Contribution of the TATA motif to Tat-mediated transcriptional activation of human immunodeficiency virus gene expression. *J Virol* 66, 5594-5597.
- Ong, C.L., Thorpe, J.C., Gorry, P.R., Bannwarth, S., Jaworowski, A., Howard, J.L., Chung, S., Campbell, S., Christensen, H.S., Clerzius, G., et al. (2005). Low TRBP levels support an innate human immunodeficiency virus type 1 resistance in astrocytes by enhancing the PKR antiviral response. *J Virol* 79, 12763-12772.
- Ott, M., Schnolzer, M., Garnica, J., Fischle, W., Emiliani, S., Rackwitz, H.R., and Verdin, E. (1999). Acetylation of the HIV-1 Tat protein by p300 is important for its transcriptional activity. *Curr Biol* 9, 1489-1492.

P

- Park, E.H., Walker, S.E., Lee, J.M., Rothenburg, S., Lorsch, J.R., and Hinnebusch, A.G. (2011). Multiple elements in the eIF4G1 N-terminus promote assembly of eIF4G1*PABP mRNPs in vivo. *EMBO J* 30, 302-316.
- Park, H., Davies, M.V., Langland, J.O., Chang, H.W., Nam, Y.S., Tartaglia, J., Paoletti, E., Jacobs, B.L., Kaufman, R.J., and Venkatesan, S. (1994). TAR RNA-binding protein is an inhibitor of the interferon-induced protein kinase PKR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 4713-4717.
- Parkin, N.T., Chamorro, M., and Varmus, H.E. (1992). Human immunodeficiency virus type 1 gag-pol frameshifting is dependent on downstream mRNA secondary structure: demonstration by expression in vivo. *J Virol* 66, 5147-5151.
- Pataer, A., Vorburger, S.A., Barber, G.N., Chada, S., Mhashilkar, A.M., Zou-Yang, H., Stewart, A.L., Balachandran, S., Roth, J.A., Hunt, K.K., et al. (2002). Adenoviral transfer of the melanoma differentiation-associated gene 7 (mda7) induces apoptosis of lung cancer cells via up-regulation of the double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR). *Cancer Res* 62, 2239-2243.
- Patel, C.V., Handy, I., Goldsmith, T., and Patel, R.C. (2000). PACT, a stress-modulated cellular activator of interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase, PKR. *J Biol Chem* 275, 37993-37998.
- Patel, R.C., and Sen, G.C. (1998). PACT, a protein activator of the interferon-induced protein kinase, PKR. *EMBO J* 17, 4379-4390.

- Pavitt, G.D., Ramaiah, K.V., Kimball, S.R., and Hinnebusch, A.G. (1998). eIF2 independently binds two distinct eIF2B subcomplexes that catalyze and regulate guanine-nucleotide exchange. *Genes Dev* 12, 514-526.
- Pavitt, G.D., Yang, W., and Hinnebusch, A.G. (1997). Homologous segments in three subunits of the guanine nucleotide exchange factor eIF2B mediate translational regulation by phosphorylation of eIF2. *Mol Cell Biol* 17, 1298-1313.
- Peruzzi, F. (2006). The multiple functions of HIV-1 Tat: proliferation versus apoptosis. *Front Biosci* 11, 708-717.
- Pestova, T.V., Lorsch, J.R. and Hellen, C.U.T. (2007). The mechanism of translation initiation in eukaryotes. In "Translational Control in Biology and Medicine", M. Mathews, N. Sonenberg and J.W.B. Hershey, eds. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 87-128.
- Peters, G.A., Hartmann, R., Qin, J., and Sen, G.C. (2001). Modular structure of PACT: distinct domains for binding and activating PKR. *Mol Cell Biol* 21, 1908-1920.
- Philippon, V., Matsuda, Z., and Essex, M. (1999). Transactivation is a conserved function among primate lentivirus Vpr proteins but is not shared by Vpx. *J Hum Virol* 2, 167-174.
- Piper, R.C., Hess, L.J., and James, D.E. (1991). Differential sorting of two glucose transporters expressed in insulin-sensitive cells. *Am J Physiol* 260, C570-580.
- Platt, E.J., Wehrly, K., Kuhmann, S.E., Chesebro, B., and Kabat, D. (1998). Effects of CCR5 and CD4 cell surface concentrations on infections by macrophagetropic isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 72, 2855-2864.
- Pomar, N., Berlanga, J.J., Campuzano, S., Hernandez, G., Elias, M., and de Haro, C. (2003). Functional characterization of *Drosophila melanogaster* PERK eukaryotic initiation factor 2alpha (eIF2alpha) kinase. *Eur J Biochem* 270, 293-306.
- Prevot, D., Darlix, J.L., and Ohlmann, T. (2003). Conducting the initiation of protein synthesis: the role of eIF4G. *Biol Cell* 95, 141-156.
- Proud, C.G. (1992). Protein phosphorylation in translational control. *Curr Top Cell Regul* 32, 243-369.

- Proud, C.G. (2005). eIF2 and the control of cell physiology. *Semin Cell Dev Biol* 16, 3-12.
- Pyo, C.W., Lee, S.H., and Choi, S.Y. (2008). Oxidative stress induces PKR-dependent apoptosis via IFN-gamma activation signaling in Jurkat T cells. *Biochem Biophys Res Commun* 377, 1001-1006.

Q

- Qiu, H., Dong, J., Hu, C., Francklyn, C.S., and Hinnebusch, A.G. (2001). The tRNA-binding moiety in GCN2 contains a dimerization domain that interacts with the kinase domain and is required for tRNA binding and kinase activation. *EMBO J* 20, 1425-1438.
- Qiu, H., Garcia-Barrio, M.T., and Hinnebusch, A.G. (1998). Dimerization by translation initiation factor 2 kinase GCN2 is mediated by interactions in the C-terminal ribosome-binding region and the protein kinase domain. *Mol Cell Biol* 18, 2697-2711.

R

- Rabbi, M.F., Saifuddin, M., Gu, D.S., Kagnoff, M.F., and Roebuck, K.A. (1997). U5 region of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat contains TRE-like cAMP-responsive elements that bind both AP-1 and CREB/ATF proteins. *Virology* 233, 235-245.
- Rafie-Kolpin, M., Chefalo, P.J., Hussain, Z., Hahn, J., Uma, S., Matts, R.L., and Chen, J.J. (2000). Two heme-binding domains of heme-regulated eukaryotic initiation factor-2alpha kinase. N terminus and kinase insertion. *J Biol Chem* 275, 5171-5178.
- Ratner, L., Haseltine, W., Patarca, R., Livak, K.J., Starcich, B., Josephs, S.F., Doran, E.R., Rafalski, J.A., Whitehorn, E.A., Baumeister, K., et al. (1985). Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III. *Nature* 313, 277-284.
- Rittenhouse, J., Turon, M.C., Helfrich, R.J., Albrecht, K.S., Weigl, D., Simmer, R.L., Mordini, F., Erickson, J., and Kohlbrenner, W.E. (1990). Affinity purification of HIV-1 and HIV-2 proteases from recombinant E. coli strains using pepstatin-agarose. *Biochem Biophys Res Commun* 171, 60-66.

- Robey, W.G., Safai, B., Oroszlan, S., Arthur, L.O., Gonda, M.A., Gallo, R.C., and Fischinger, P.J. (1985). Characterization of envelope and core structural gene products of HTLV-III with sera from AIDS patients. *Science* 228, 593-595.
- Roebuck, K.A., Brenner, D.A., and Kagnoff, M.F. (1993). Identification of c-fos-responsive elements downstream of TAR in the long terminal repeat of human immunodeficiency virus type-1. *J Clin Invest* 92, 1336-1348.
- Roebuck, K.A., and Saifuddin, M. (1999). Regulation of HIV-1 transcription. *Gene Expr* 8, 67-84.
- Romano, P.R., Garcia-Barrio, M.T., Zhang, X., Wang, Q., Taylor, D.R., Zhang, F., Herring, C., Mathews, M.B., Qin, J., and Hinnebusch, A.G. (1998). Autophosphorylation in the activation loop is required for full kinase activity in vivo of human and yeast eukaryotic initiation factor 2alpha kinases PKR and GCN2. *Mol Cell Biol* 18, 2282-2297.
- Ron, D. and Harding, H.P. (2007). eIF2 α phosphorylation in cellular stress responses and disease. In "Translational Control in Biology and Medicine", M. Mathews, N. Sonenberg and J.W.B. Hershey, eds. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 345-368.
- Ron, D., and Walter, P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 519-529.
- Rowlands, A.G., Panniers, R., and Henshaw, E.C. (1988). The catalytic mechanism of guanine nucleotide exchange factor action and competitive inhibition by phosphorylated eukaryotic initiation factor 2. *J Biol Chem* 263, 5526-5533.

S

- Samuel, C.E. (1993). The eIF-2 alpha protein kinases, regulators of translation in eukaryotes from yeasts to humans. *J Biol Chem* 268, 7603-7606.
- Santoyo, J., Alcalde, J., Mendez, R., Pulido, D., and de Haro, C. (1997). Cloning and characterization of a cDNA encoding a protein synthesis initiation factor-2alpha (eIF-2alpha) kinase from *Drosophila melanogaster*. Homology To yeast GCN2 protein kinase. *J Biol Chem* 272, 12544-12550.

- Satoh, S., Hijikata, M., Handa, H., and Shimotohno, K. (1999). Caspase-mediated cleavage of eukaryotic translation initiation factor subunit 2alpha. *Biochem J* 342 (Pt 1), 65-70.
- Schmedt, C., Green, S.R., Manche, L., Taylor, D.R., Ma, Y., and Mathews, M.B. (1995). Functional characterization of the RNA-binding domain and motif of the double-stranded RNA-dependent protein kinase DAI (PKR). *J Mol Biol* 249, 29-44.
- Schmitt, E., Blanquet, S., and Mechulam, Y. (2002). The large subunit of initiation factor aIF2 is a close structural homologue of elongation factors. *EMBO J* 21, 1821-1832.
- Schubert, U., Bour, S., Ferrer-Montiel, A.V., Montal, M., Maldarell, F., and Strebel, K. (1996). The two biological activities of human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein involve two separable structural domains. *J Virol* 70, 809-819.
- Schwartz, S., Felber, B.K., and Pavlakis, G.N. (1991). Expression of human immunodeficiency virus type 1 vif and vpr mRNAs is Rev-dependent and regulated by splicing. *Virology* 183, 677-686.
- Seelamgari, A., Maddukuri, A., Berro, R., de la Fuente, C., Kehn, K., Deng, L., Dadgar, S., Bottazzi, M.E., Ghedin, E., Pumfery, A., et al. (2004). Role of viral regulatory and accessory proteins in HIV-1 replication. *Front Biosci* 9, 2388-2413.
- Sheehy, A.M., Gaddis, N.C., Choi, J.D., and Malim, M.H. (2002). Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* 418, 646-650.
- Sherman, M.P., Schubert, U., Williams, S.A., de Noronha, C.M., Kreisberg, J.F., Henklein, P., and Greene, W.C. (2002). HIV-1 Vpr displays natural protein-transducing properties: implications for viral pathogenesis. *Virology* 302, 95-105.
- Solis, M., Wilkinson, P., Romieu, R., Hernandez, E., Wainberg, M.A., and Hiscott, J. (2006). Gene expression profiling of the host response to HIV-1 B, C, or A/E infection in monocyte-derived dendritic cells. *Virology* 352, 86-99.
- Sonenberg, N., and Hinnebusch, A.G. (2009). Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* 136, 731-745.

- Stojdl, D.F., Abraham, N., Knowles, S., Marius, R., Brasey, A., Lichty, B.D., Brown, E.G., Sonenberg, N., and Bell, J.C. (2000). The murine double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR is required for resistance to vesicular stomatitis virus. *J Virol* 74, 9580-9585.

T

- Thompson, G.M., Pacheco, E., Melo, E.O., and Castilho, B.A. (2000). Conserved sequences in the beta subunit of archaeal and eukaryal translation initiation factor 2 (eIF2), absent from eIF5, mediate interaction with eIF2gamma. *Biochem J* 347 Pt 3, 703-709.
- Tobiume, M., Takahoko, M., Yamada, T., Tatsumi, M., Iwamoto, A., and Matsuda, M. (2002). Inefficient enhancement of viral infectivity and CD4 downregulation by human immunodeficiency virus type 1 Nef from Japanese long-term nonprogressors. *J Virol* 76, 5959-5965.
- Tungaturthi, P.K., Sawaya, B.E., Singh, S.P., Tomkiewicz, B., Ayyavoo, V., Khalili, K., Collman, R.G., Amini, S., and Srinivasan, A. (2003). Role of HIV-1 Vpr in AIDS pathogenesis: relevance and implications of intravirion, intracellular and free Vpr. *Biomed Pharmacother* 57, 20-24.

V

- Van Lint, C., Amella, C.A., Emiliani, S., John, M., Jie, T., and Verdin, E. (1997). Transcription factor binding sites downstream of the human immunodeficiency virus type 1 transcription start site are important for virus infectivity. *J Virol* 71, 6113-6127.
- Ventoso, I., Blanco, R., Perales, C., and Carrasco, L. (2001). HIV-1 protease cleaves eukaryotic initiation factor 4G and inhibits cap-dependent translation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 12966-12971.
- Vorburger, S.A., Pataer, A., Yoshida, K., Barber, G.N., Xia, W., Chiao, P., Ellis, L.M., Hung, M.C., Swisher, S.G., and Hunt, K.K. (2002). Role for the double-stranded RNA activated protein kinase PKR in E2F-1-induced apoptosis. *Oncogene* 21, 6278-6288.

W

- Watson, J.D., Baker, T.A., Bell, S.P., Gann, A., Levine, M. and Losick, R. (2004). *Molecular Biology of the Gene*. Quinta edición. Ed. Benjamin Cummings. San Francisco. USA.
- Wek, S.A., Zhu, S., and Wek, R.C. (1995). The histidyl-tRNA synthetase-related sequence in the eIF-2 alpha protein kinase GCN2 interacts with tRNA and is required for activation in response to starvation for different amino acids. *Mol Cell Biol* 15, 4497-4506.

Y

- Yanagiya, A., Svitkin, Y.V., Shibata, S., Mikami, S., Imataka, H., and Sonenberg, N. (2009). Requirement of RNA binding of mammalian eukaryotic translation initiation factor 4GI (eIF4GI) for efficient interaction of eIF4E with the mRNA cap. *Mol Cell Biol* 29, 1661-1669.
- Yang, J.M., London, I.M., and Chen, J.J. (1992). Effects of hemin and porphyrin compounds on intersubunit disulfide formation of heme-regulated eIF-2 alpha kinase and the regulation of protein synthesis in reticulocyte lysates. *J Biol Chem* 267, 20519-20524.
- Yang, X., Gold, M.O., Tang, D.N., Lewis, D.E., Aguilar-Cordova, E., Rice, A.P., and Herrmann, C.H. (1997). TAK, an HIV Tat-associated kinase, is a member of the cyclin-dependent family of protein kinases and is induced by activation of peripheral blood lymphocytes and differentiation of promonocytic cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12331-12336.
- Yang, Y.L., Reis, L.F., Pavlovic, J., Aguzzi, A., Schafer, R., Kumar, A., Williams, B.R., Aguet, M., and Weissmann, C. (1995). Deficient signaling in mice devoid of double-stranded RNA-dependent protein kinase. *EMBO J* 14, 6095-6106.
- Yao, X.J., Lemay, J., Rougeau, N., Clement, M., Kurtz, S., Belhumeur, P., and Cohen, E.A. (2002). Genetic selection of peptide inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 Vpr. *J Biol Chem* 277, 48816-48826.

- Yatime, L., Mechulam, Y., Blanquet, S., and Schmitt, E. (2006). Structural switch of the gamma subunit in an archaeal aIF2 alpha gamma heterodimer. *Structure* 14, 119-128.
- Yatime, L., Schmitt, E., Blanquet, S., and Mechulam, Y. (2004). Functional molecular mapping of archaeal translation initiation factor 2. *J Biol Chem* 279, 15984-15993.
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Matsumoto, K., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Foy, E., Loo, Y.M., Gale, M., Jr., Akira, S., et al. (2005). Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J Immunol* 175, 2851-2858.
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S., and Fujita, T. (2004). The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* 5, 730-737.

Z

- Zhan, K., Narasimhan, J., and Wek, R.C. (2004). Differential activation of eIF2 kinases in response to cellular stresses in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* 168, 1867-1875.
- Zhan, K., Vattam, K.M., Bauer, B.N., Dever, T.E., Chen, J.J., and Wek, R.C. (2002). Phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2 by heme-regulated inhibitor kinase-related protein kinases in *Schizosaccharomyces pombe* is important for resistance to environmental stresses. *Mol Cell Biol* 22, 7134-7146.
- Zhang, H., Yang, B., Pomerantz, R.J., Zhang, C., Arunachalam, S.C., and Gao, L. (2003). The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA. *Nature* 424, 94-98.
- Zhang, S., Feng, Y., Narayan, O., and Zhao, L.J. (2001). Cytoplasmic retention of HIV-1 regulatory protein Vpr by protein-protein interaction with a novel human cytoplasmic protein VprBP. *Gene* 263, 131-140.
- Zhao, R.Y., Li, G., and Bukrinsky, M.I. (2011). Vpr-host interactions during HIV-1 viral life cycle. *J Neuroimmune Pharmacol* 6, 216-229.
- Zheng, X., and Bevilacqua, P.C. (2004). Activation of the protein kinase PKR by short double-stranded RNAs with single-stranded tails. *RNA* 10, 1934-1945.

- Zhu, Y., Pe'ery, T., Peng, J., Ramanathan, Y., Marshall, N., Marshall, T., Amendt, B., Mathews, M.B., and Price, D.H. (1997). Transcription elongation factor P-TEFb is required for HIV-1 tat transactivation in vitro. *Genes Dev* 11, 2622-2632.

ANEXO

GCN2 Has Inhibitory Effect on Human Immunodeficiency Virus-1 Protein Synthesis and Is Cleaved upon Viral Infection

Javier del Pino¹, José Luis Jiménez², Iván Ventoso¹, Alfredo Castelló^{1*}, M^a Ángeles Muñoz-Fernández³, César de Haro¹, Juan José Berlanga^{1*}

1 Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM), Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain, **2** Plataforma de Laboratorio, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain, **3** Laboratory of Molecular Immunobiology, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain

Abstract

The reversible phosphorylation of the alpha-subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 (eIF2alpha) is a well-characterized mechanism of translational control in response to a wide variety of cellular stresses, including viral infection. Beside PKR, the eIF2alpha kinase GCN2 participates in the cellular response against viral infection by RNA viruses with central nervous system tropism. PKR has also been involved in the antiviral response against HIV-1, although this antiviral effect is very limited due to the distinct mechanisms evolved by the virus to counteract PKR action. Here we report that infection of human cells with HIV-1 conveys the proteolytic cleavage of GCN2 and that purified HIV-1 and HIV-2 proteases produce direct proteolysis of GCN2 in vitro, abrogating the activation of GCN2 by HIV-1 RNA. Transfection of distinct cell lines with a plasmid encoding an HIV-1 cDNA clone competent for a single round of replication resulted in the activation of GCN2 and the subsequent eIF2alpha phosphorylation. Moreover, transfection of GCN2 knockout cells or cells with low levels of phosphorylated eIF2alpha with the same HIV-1 cDNA clone resulted in a marked increase of HIV-1 protein synthesis. Also, the over-expression of GCN2 in cells led to a diminished viral protein synthesis. These findings suggest that viral RNA produced during HIV-1 infection activates GCN2 leading to inhibition of viral RNA translation, and that HIV-1 protease cleaves GCN2 to overcome its antiviral effect.

Citation: del Pino J, Jiménez JL, Ventoso I, Castelló A, Muñoz-Fernández MÁ, et al. (2012) GCN2 Has Inhibitory Effect on Human Immunodeficiency Virus-1 Protein Synthesis and Is Cleaved upon Viral Infection. PLoS ONE 7(10): e47272. doi:10.1371/journal.pone.0047272

Editor: Jean-Luc E. P. H. Darlix, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, France

Received: June 27, 2012; **Accepted:** September 10, 2012; **Published:** October 23, 2012

Copyright: © 2012 del Pino et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported in part by grants BFU2007-62987 (to CDH), BFU2006-12822 and BFU2009-09469 (to JJB) from the Dirección General de Investigación Científica y Técnica (DGICYT), a grant from the Fundación Ramón Areces (to CDH), a grant from Universidad Autónoma de Madrid and the Government of Madrid (to JJB), grants PS09-02029 and RD06-0006-0035 (to MAM-F) and PI081495 (to JLJ) from Fondo de Investigaciones Sanitarias, and an institutional grant from the Fundación Ramón Areces to the Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. JDP was supported by a Ph.D. fellowship from the Ministerio de Ciencia y Tecnología (Government of Spain). JLJ is supported by Programa de Investigación de la Consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: jberlanga@cbm.uam.es.

‡ Current address: European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, Germany

Introduction

The control of protein synthesis is central to the global process of regulation of gene expression, first leading to translational reprogramming and, as a consequence, affecting the transcriptional profile of cells. Protein synthesis is basically regulated at the initiation step, where phosphorylation of the alpha subunit of initiation factor eIF2 (eIF2alpha) at residue Ser-51 by specific protein kinases represents one of the best-characterized mechanisms regulating mRNA translation in eukaryotic cells in response to various stress conditions, such as lack of nutrients, endoplasmic reticulum stress, iron deficiency, heat shock and viral infection [1,2]. In mammalian cells, four different eIF2alpha kinases regulated by specific signals have been identified: HRI (iron deficiency) [3,4]; PKR (double-stranded RNA produced in cells infected by viruses) [5]; PERK (stress situations in the endoplasmic reticulum) [1]; and GCN2 (amino acid or serum deprivation and ultraviolet light irradiation) [6,7,8]. Some members of this family of eIF2alpha kinases are also present in other eukaryotic

organisms: PERK and GCN2 in *Drosophila melanogaster* [5,9,10]; GCN2 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* [11] and two eIF2alpha kinases related to mammalian HRI (Hri1 and Hri2), in addition to GCN2, in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* [12].

eIF2 forms a ternary complex with GTP and the initiator methionyl-tRNA, which delivers the latter to the small ribosomal subunit with the subsequent hydrolysis of GTP. The conversion of inactive eIF2-GDP into active eIF2-GTP is catalyzed by the guanine nucleotide exchange factor eIF2B. Phosphorylation of eIF2alpha at Ser-51 increases its affinity for eIF2B, which then becomes sequestered in a stable and inactive complex, leading to the inhibition of protein synthesis due to the lack of ternary complexes.

GCN2 was first described in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* where the kinase is activated in response to amino acid starvation through the binding of uncharged tRNA to a region homologous to the histidyl-tRNA synthetases (HisRS) [13]. In mammals, this region is also responsible for the in vitro activation of GCN2 by tRNA and viral RNA [14]. Thus GCN2 has been

involved in the antiviral response against RNA viruses, such as Semliki Forest virus, vesicular stomatitis virus and Sindbis virus (SV), whose genomic RNA is able to bind and activate the kinase, which through the phosphorylation of eIF2 α inhibits the translation of the genomic mRNA of SV and blocks its replication cycle in cells [14]. It is well known the central role of PKR in the cellular antiviral response as well as the different strategies developed by distinct viruses in order to counteract the negative effects of PKR on virus replication. These evasion strategies include proteins that inhibit PKR, sequester dsRNA, or are pseudosubstrates, and RNA molecules acting as pseudoactivators that compete with activator dsRNA for the binding to PKR [15]. Thus, during HIV-1 infection, PKR is first transiently activated and then inhibited due to viral and virus-activated cellular mechanisms of control [16,17].

Many viruses have evolved mechanisms that modify the activity of cellular translation factors in order to favor viral mRNA translation to the detriment of cellular mRNA translation. The best-characterized example of that is the proteolytic cleavage of eIF4G by proteases of different viruses, leading to the inhibition of capped cellular mRNA translation and to the enhancement of translation of uncapped viral RNAs [18]. Thus, eIF4G is cleaved by 2A protease of rhinovirus or poliovirus, L protease of aphthovirus, and proteases of several retroviruses, including HIV-1 and HIV-2 [19,20,21]. Another protein involved in translation, PABP, is also a target for viral proteases, including 2A and 3C of enterovirus [22,23], and the proteases of HIV-1 and HIV-2 [24].

HIV-1 protein translation occurs late in the viral life cycle in the cytoplasm of cells and is carried out by the host protein synthesis machinery. HIV-1 protease (HIV-1^{Pro}) is a small enzyme that mediates the cleavage of Gag, Gag-Pol, and Nef precursor polyproteins during virion assembly and maturation [16].

In this paper we show that HIV-1 RNA activates GCN2 *in vivo* and *in vitro* and that the cleavage of the kinase by HIV-1^{Pro} leads to its inactivation. Synthesis of HIV-1 proteins in cells transfected with a plasmid encoding the viral RNA increased in cells devoid of the GCN2 gene. All these results suggest that GCN2 is involved in the cellular antiviral response against HIV-1 infection.

Results

HIV-1 RNA promotes GCN2 activation *in vitro* through its HisRS-related domain

Given that the genomic RNA of Sindbis virus activated GCN2 *in vitro* and that GCN2 have an antiviral effect against this virus [14], we tested whether the genomic RNA of other viruses could activate GCN2 as a sign of a potential antiviral effect against them. We observed that *in vitro* transcribed HIV-1 genomic RNA, among others, was able to significantly increase the eIF2 α kinase activity of affinity purified GCN2 in a dose-dependent manner (Figure 1A). This activation was dependent on its HisRS-related domain, as the GCN2-m2 mutant of this domain showed very low autophosphorylation and eIF2 α kinase activity compared to that of the wild type protein (Figure 1B). As expected, no autophosphorylation or eIF2 α kinase activity was found when using the GCN2 form bearing a mutation in the lysine residue of the kinase domain responsible for the ATP binding (K618R). GCN2 activation by HIV-1 RNA was comparable to that obtained by using Sindbis virus RNA, which served as a positive control in these assays.

GCN2 cleavage in cells after HIV-1 infection

In order to investigate the putative role of GCN2 in the cellular antiviral response against HIV-1, we tested GCN2 activation in MT-2 (human T-lymphocyte cell line) cells infected with HIV-1. To our surprise, the analysis of the cell lysates revealed the disappearance of GCN2 upon HIV-1 infection coinciding with the cleavage and disappearance of full length eIF4GI. Both protein bands were apparently intact at day 1, but disappeared at day 3 after infection, and their cleavage was prevented in presence of the specific inhibitor of the HIV-1 protease (HIV-1^{Pro}) saquinavir (Figure 1 C and D). In the case of GCN2 we were unable to detect any proteolytic fragment, but the cleavage of eIF4GI rendered the expected carboxi-terminal Ct-2 (about 102 kDa) and Ct-3 (about 57 kDa) fragments [20]. Moreover, infection of Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) with HIV-1 resulted in a significant proteolytic degradation of GCN2 (45% reduction) and eIF4GI at 4 and 5 dpi, which was prevented in the presence of saquinavir (Figure 1E), strongly suggesting that the low levels of these proteins present in the cells were a consequence of HIV-1^{Pro} cleavage. The level of other proteins such as PKR, actin or eIF2 α remained unaltered to the same extent throughout the experiment. Note that in Figure 1 D and E, the HIV-1 p24 protein only appeared in the absence of saquinavir as a consequence of HIV-1^{Pro} processing of the Gag (55 kDa) precursor. We also observed increased phosphorylation of eIF2 α upon HIV-1 infection (Figure 1 C and E), suggesting a possible activation of GCN2.

HIV-1 protease directly cleaves GCN2

Next, we tested the ability of HIV-1^{Pro} to cleave GCN2 by using different approaches. First, we checked the cleavage of GCN2 in cells where the protease was expressed in a context in which other HIV-1 proteins were absent. With this aim, we expressed HIV-1^{Pro} in BHK-21 cells by electroporation of an *in vitro* transcribed RNA bearing the protease-coding region in the context of SV genomic mRNA [25]. As controls we used similar RNAs in order to express the 2A protease of poliovirus (PV-2A^{Pro}) or just SV capsid C protein (Figure 2A). At 4 hours post-electroporation, we could observe a marked decrease in the amount of endogenous GCN2 and the appearance of a proteolytic fragment of an apparent molecular weight of 130–140 kDa, accounting for a specific cleavage of GCN2 by HIV-1^{Pro}. In contrast, PV-2A^{Pro} was unable to cut GCN2, but, as expected, eIF4GI was proteolytically degraded by both PV-2A^{Pro} and HIV-1^{Pro}. We also assayed the proteolytic activity of HIV-1^{Pro} on GCN2 in COS-7 cells transfected with pTM1-derived plasmids and infected with vaccinia virus encoding T7 polymerase (Figure 2B). Co-expression of HIV-1^{Pro} with mouse or human GCN2 resulted in the production of a cleavage fragment similar to the one obtained in BHK-21 cells expressing the protease.

To further study GCN2 proteolytic degradation we performed experiments in which purified HIV-1^{Pro} was added to HeLa cell-free extracts. Complete proteolysis of GCN2 was achieved after only 15 min of incubation, whereas in the same extracts a significant amount of eIF4GI remained intact after 30 min (Figure 2D). The cleavage of both proteins was prevented when the protease was used in the presence of saquinavir. PABP, another known HIV-1^{Pro} substrate, seemed to be processed to a much lower extent and the amount of other proteins such as actin did not experience significant changes.

Moreover, affinity-purified mouse and human GCN2 were cleaved *in vitro* after incubation with purified HIV-1^{Pro} and HIV-2^{Pro} (Figure 2C). Both viral proteases rendered GCN2 proteolytic fragments of the same size, suggesting that these proteases directly

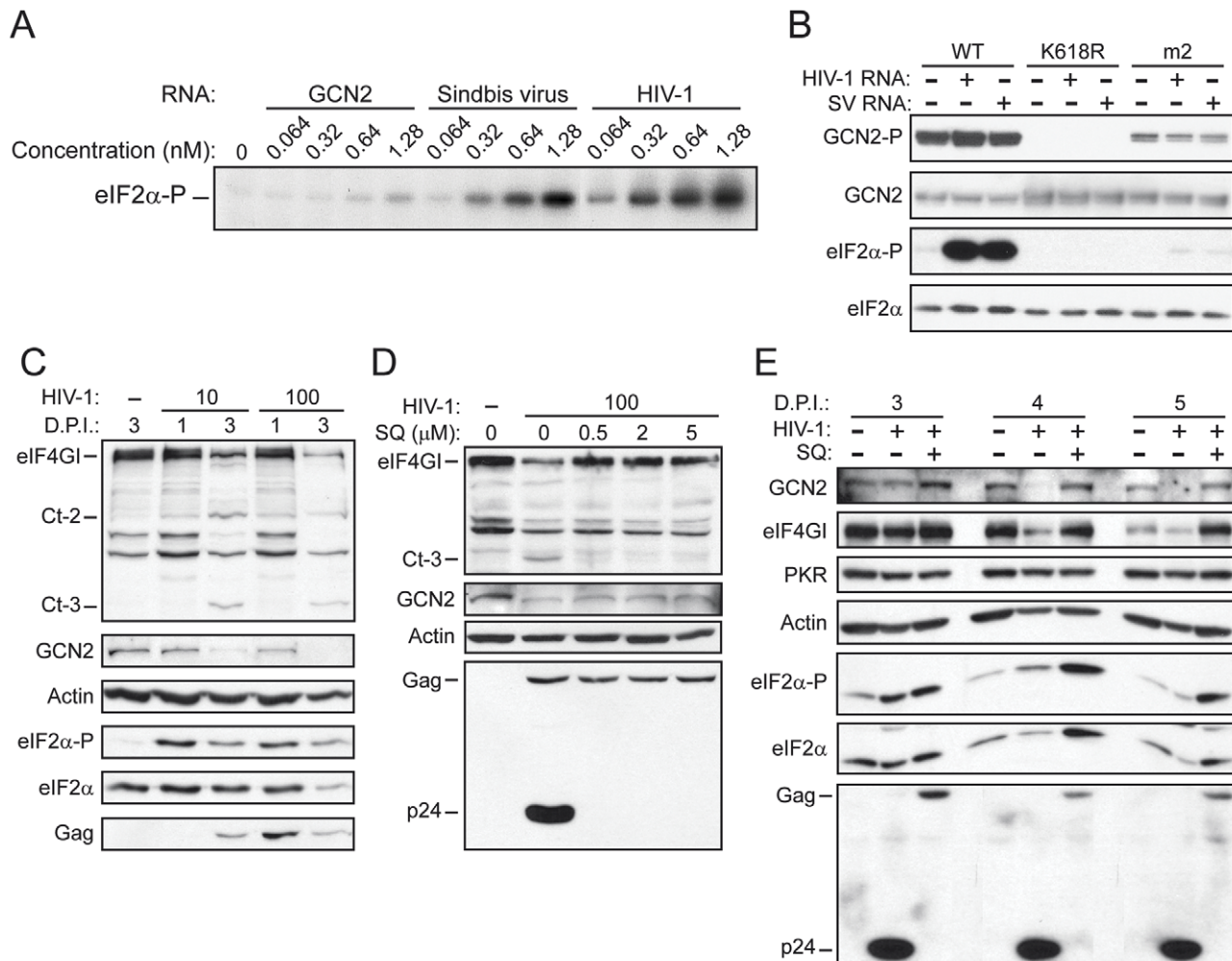


Figure 1. HIV-1 RNA activates GCN2 and the kinase is proteolytically cleaved during HIV-1 infection. (A) Purified mouse GCN2 was subjected to in vitro eIF2α kinase assay in the presence of increasing concentrations of in vitro transcribed RNAs corresponding to the mouse GCN2 open reading frame (as a negative control), or to the genomic RNAs of Sindbis virus or HIV-1, respectively, as indicated. In this experiment 32 P-γ-ATP was included in the kinase reaction mix and phosphorylation of eIF2α was visualized after analysis by SDS-PAGE and autoradiography. (B) In vitro eIF2α kinase assay of purified wild type GCN2 (WT), GCN2-K618R (K618R) or GCN2-m2 (m2) in the presence of Sindbis virus (SV) or HIV-1 RNA, as indicated. Results were obtained by western blot analysis of the samples using different antisera to detect eIF2α phosphorylated on serine 51, total eIF2α and phosphorylated and total GCN2. (C) MT-2 cells were mock infected (–) or infected with 10 or 100 ng of p24^{gag} per 10⁶ cells of HIV-1_{NL4-3} and harvested at the indicated days post-infection (D.P.I.). Aliquots of cell lysates containing equal amount of proteins were analyzed by western blot (8% SDS-PAGE) using specific antibodies as indicated. (D) MT-2 cells were mock-infected (–) or infected with 100 ng of HIV-1 NL4-3 per 10⁶ cells, in the absence or the presence of the indicated concentrations of saquinavir (SQ) and harvested at day 3 post-infection. Aliquots of cell lysates containing equal amounts of proteins were analyzed by immunoblot (10% SDS-PAGE) using specific antibodies as indicated. (E) PHA-stimulated PBMCs were mock-infected (–) or infected with 100 ng of HIV-1 NL4-3 per 10⁶ cells, in the absence or the presence of 0.5 μM SQ and harvested at the indicated D.P.I. Aliquots of cell lysates containing equal amounts of proteins were analyzed by immunoblot using specific antibodies as indicated. Results are representative of at least three independent experiments. doi:10.1371/journal.pone.0047272.g001

cleaved both mouse and human GCN2 at the same, or a very close, site.

Identification of the HIV-1 protease cleavage site on GCN2

Given that HIV-1^{Pro} produced a direct proteolytic break in GCN2, we next tried to identify the precise site/s of cleavage. Based on the size of the major GCN2 fragment obtained by the action of the protease, we constructed bacterial expression plasmids in order to express and purify GST fusion proteins bearing a portion of mouse (aa 419–1024) or human (aa 525–1024) GCN2, which was supposed to contain the cleavage site. We

used truncated recombinant proteins due to the low yield of full-length GCN2 protein in bacteria. Protease treatment produced a major carboxy-terminal fragment with an apparent molecular weight of about 67 kDa in both mouse and human proteins (Figure 2E). In the case of the human protein there was a minor additional product of about 73 kDa which could account for a secondary cleavage site. The major 67 kDa polypeptide was subjected to amino-terminal sequencing by using the Edman degradation method, which rendered the amino acid sequences VETVIP for the human protein and IETVIP for the mouse protein, which correspond to a cleavage site between residues 560 and 561 or 559 and 560, respectively. Thus the cleavage sites identified are compatible with the size of the carboxy-terminal

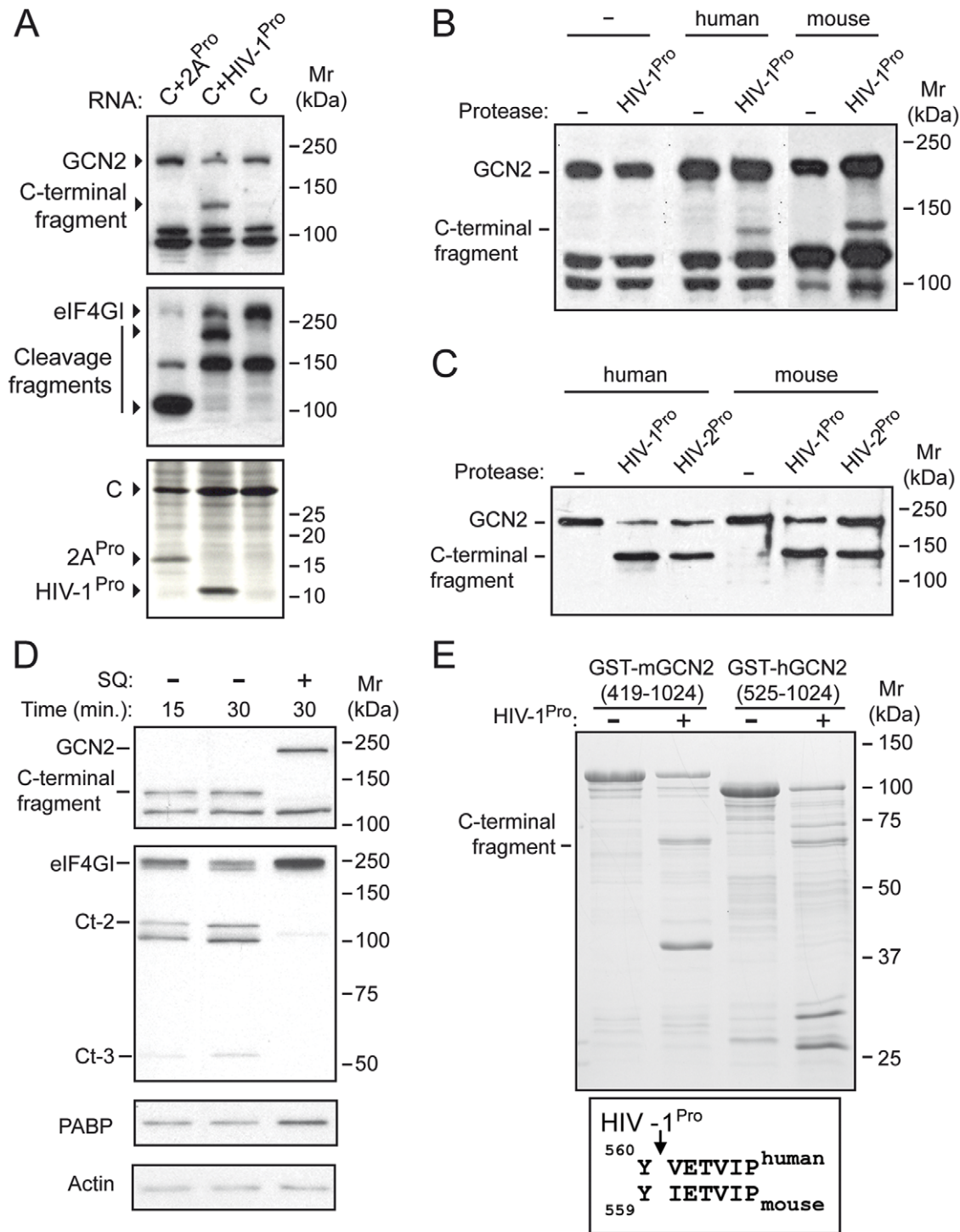


Figure 2. HIV-1 protease directly cleaves GCN2. (A) BHK-21 cells were transfected by electroporation with in vitro transcribed capped Sindbis virus RNAs from plasmids pT7SV-HIV-1PR (C+HIV-1^{Pro}), pT7SV-2A^{Pro} (C+2A^{Pro}), pT7SVwt (C) for the expression of HIV-1 and PV-2A proteases. After 4 h cells were metabolically labeled with [³⁵S]-Met-Cys. Equivalent amounts of total protein were subjected to 12% SDS-PAGE, transferred to PDVF membranes and subjected to autoradiography (lower panel) to visualize protease expression. The membranes were then probed with specific antisera for detection of endogenous GCN2 and eIF4GI as indicated. (B) COS-7 cells were subjected to coupled infection/DNA transfection with recombinant vaccinia virus (vvT7), pTM1 (–) or pTM1-derived plasmid encoding HIV-1^{Pro} and pcDNA3.1/Myc-His plasmid, empty (–) or encoding human or mouse GCN2. At 18 h post-transfection cells were lysed and equivalent amounts of total protein were analyzed by western blot using a specific antiserum for detection of GCN2. (C) Affinity purified mouse or human GCN2 was incubated for 3 h at 30°C in the absence or the presence of HIV-1 or HIV-2 proteases. Incubation was stopped by addition of SDS-PAGE sample buffer and proteins were analyzed by western blot using a specific antiserum for detection of GCN2. (D) HeLa cell-free extracts were incubated with recombinant HIV-1^{Pro} in the absence or the presence of 2.5 μM SQ for the indicated times. Proteins were analyzed by western blot using specific antisera for detection of GCN2, eIF4GI, PABP or actin as indicated. (E) Purified mouse and human GCN2 GST-fusion proteins were incubated in the presence of recombinant HIV-1^{Pro} for 3 h at 30°C. Proteins were resolved

in SDS-PAGE and stained with Coomassie blue. Shown in the lower box is the GCN2 sequence obtained by Edman degradation of the indicated C-terminal fragments. Results are representative of at least three independent experiments.
doi:10.1371/journal.pone.0047272.g002

GCN2 fragments detected, in the *in vivo* and the *in vitro* experiments, using an anti-GCN2 antibody directed against the central portion of the kinase (aa 419–1024).

HIV-1 protease cleavage abrogates GCN2 activity

To test whether the proteolytic cleavage by HIV-1^{Pro} led to the inactivation of GCN2, we assayed GCN2 *in vitro* activity after incubation with HIV-1^{Pro}. Incubation of GCN2 with HIV-1^{Pro} previous to the eIF2 α kinase assay rendered a cleaved form of GCN2 which was just slightly phosphorylated and unable to phosphorylate eIF2 α (Figure 3A, lane 3). To make sure that this effect was due to the proteolytic activity of HIV-1^{Pro}, we also performed the assay in the presence of saquinavir, which was added just before the incubation of the protease with GCN2 (Figure 3A, lane 5) or, alternatively, after the incubation of the kinase and the protease, just before initiating the kinase assay (Figure 3A, lane 6). The presence of saquinavir prevented GCN2 cleavage by the viral protease and allowed phosphorylation of the kinase and of eIF2 α . Thus, we unequivocally concluded that HIV-1^{Pro} activity on GCN2 causes the inactivation of the kinase.

To further investigate the observed effect of HIV-1^{Pro} action on GCN2 activity, we expressed, purified and assayed two polypeptides equivalent to those obtained by HIV-1^{Pro} action on human GCN2, i.e., GCN2 aa 1–560 and aa 561–1649, respectively (Figure 3B). The amino-terminal polypeptide was quite inactive (Figure 3C, lanes 3 and 4), but the carboxi-terminal protein fragment retained some of the ability to phosphorylate eIF2 α in the presence of HIV-1 RNA (Figure 3C, lanes 5 and 6), although it was significantly lower than the activity shown by the full length GCN2 protein (Figure 3C, lanes 7 and 8). This result corroborates the fact that GCN2 proteolytic cleavage by HIV-1^{Pro} leads to the inactivation of the kinase.

GCN2 activity inhibits HIV-1 RNA translation

We wanted to test whether the activity of GCN2 had an effect on the synthesis of HIV-1 proteins. To this end, we used two plasmids encoding the HIV-1 genome in which *luciferase* or *GFP* genes were inserted into the pNL4-3 *nef* gene (pNL4-3.Luc.R-E- and pNL4-3.GFP.R-E-). First, we co-transfected HeLa cells with HIV-1 constructs (pNL4-3.Luc.R-E- or pNL4-3.GFP.R-E-) or pcDNA-Luc, along with the plasmids encoding either wild type GCN2 or the inactive mutant GCN2-K618R. Luciferase activity and GFP expression were significantly higher in cells over-expressing GCN2-K618R when compared with the ones bearing wild type GCN2 (Figure 4A and B), suggesting a possible negative effect of GCN2 activity on HIV-1 protein synthesis. We also wanted to analyze whether the absence of GCN2 in cells could affect HIV-1 protein expression. To do so, we transfected the plasmids pNL4-3.Luc.R-E- or pcDNA-Luc in MEFs devoid of GCN2 (Figure 4E) or in HeLa cells showing low levels of GCN2 due to the stable expression of a specific interfering RNA (RNAi 4) (Figure 4C and D). In both cases the relative luciferase expression from the HIV-1 clone was significantly increased (more than 2-fold) in cells with low or absent GCN2 activity when compared with wild type MEFs or HeLa cells bearing a unspecific RNAi. Moreover, in HeLa cells where GCN2 was knocked down we found high levels of GFP and HIV-1 p24 proteins compared to cells bearing normal levels of GCN2 (Figure 4C). These results suggest that GCN2 activity inhibits HIV-1 protein synthesis.

HIV-1 RNA activates GCN2 in cells

We performed transfection with the above mentioned HIV-1 RNA-encoding plasmids in a BHK-21 cell line that over-expresses the regulatory subunit of PP1 phosphatase, GADD34, rendering cells with low levels of phosphorylated eIF2 α , BHK-A1 (Figure S1). In these cells the expression of HIV-1 constructs induced a significant phosphorylation of GCN2 and the subsequent increase in the levels of phosphorylated eIF2 α , which was also observed in MEFs and HeLa cells (Figure 5A, B and C) transfected with plasmids encoding HIV-1 RNA. It is also noteworthy that the amount of GFP, as a reporter of viral protein synthesis, was higher in the BHK-A1 cell line and in GCN2 knock out (GCN2^{−/−}) than in wild-type MEFs (Figure 5A and B). We also observed that luciferase activity expressed from a HIV-1 RNA was higher in BHK-A1 cells, in cells expressing a non-phosphorylatable form of eIF2 α and in GCN2^{−/−} MEFs than in the respective control cells, BHK-C and wild type MEFs (Figure 5D, E and F). This increase should be caused by differences in translation, given that the levels of the luciferase-encoding HIV-1 RNA did not rise in those cells (Figure 5D and E). Thus we can conclude that HIV-1 RNA activates GCN2, which in turn phosphorylates eIF2 α leading to the inhibition of HIV-1 RNA translation.

Discussion

In eukaryotic cells the translation of mRNAs into proteins is mainly regulated at the initiation step, where regulation of the eIF2 function by phosphorylation of its α subunit by specific protein kinases (eIF2 α kinases) plays a critical role, given that eIF2 α phosphorylation leads to a general inhibition of protein synthesis. Synthesis of viral proteins relies on the host cell translation machinery and thus is similarly regulated. In fact, phosphorylation of eIF2 α by activated eIF2 α kinases PKR and GCN2 has been shown to be an important mechanism for inhibition of viral protein synthesis and viral cycle progression [14,26].

Here we report that the presence of HIV-1 RNA increases GCN2 eIF2 α kinase activity *in vitro* and that this increase is dependent on the m2 motif in the HisRS-related domain of the kinase. This effect of a viral RNA on GCN2 activity was previously observed for the genomic RNA of Sindbis virus [14], suggesting that GCN2 is an RNA binding protein which senses the presence in the cells of viral RNAs through its HisRS-related domain in order to activate an antiviral response. Unlike the previous report on Sindbis virus [14], we have not yet identified the RNA sequences of HIV-1 RNA responsible for the activation of GCN2. As shown in this work, the introduction of HIV-1 RNA by transfection of cells with an HIV-1-encoding cDNA produced the activation of GCN2 and a subsequent increase in the levels of phosphorylated eIF2 α , similar to what was observed *in vitro*. The consequence of this fact is a reduction in the levels of proteins whose synthesis depends on the translation of HIV-1 RNA and, finally, it could lead to diminished virus production. It is not surprising that phosphorylation of eIF2 α led to the inhibition of the viral protein synthesis, as has been widely proven that over-expression and activation of the eIF2 α kinase PKR produces the same effect [17,27]. The novelty of our results is that the inhibitory phenomenon is due to the activation of GCN2, given that it has been observed by comparison of HIV-1 protein

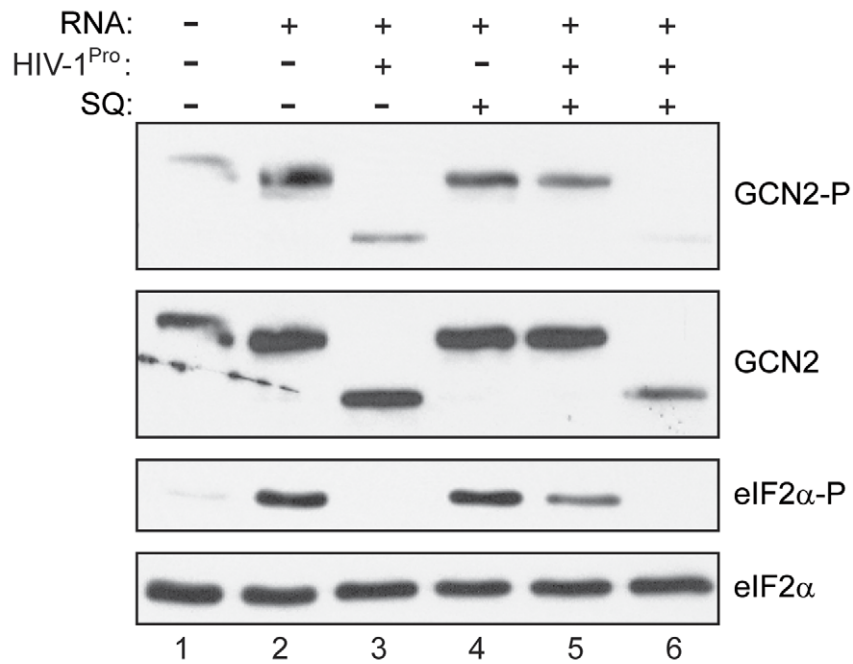
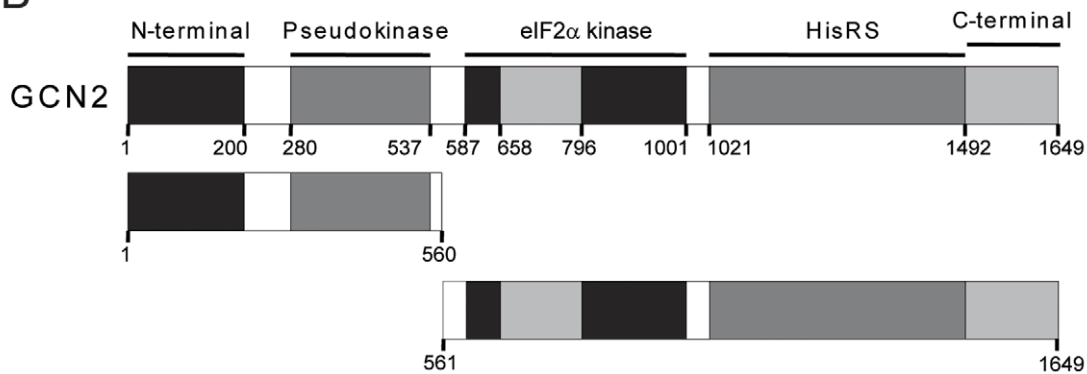
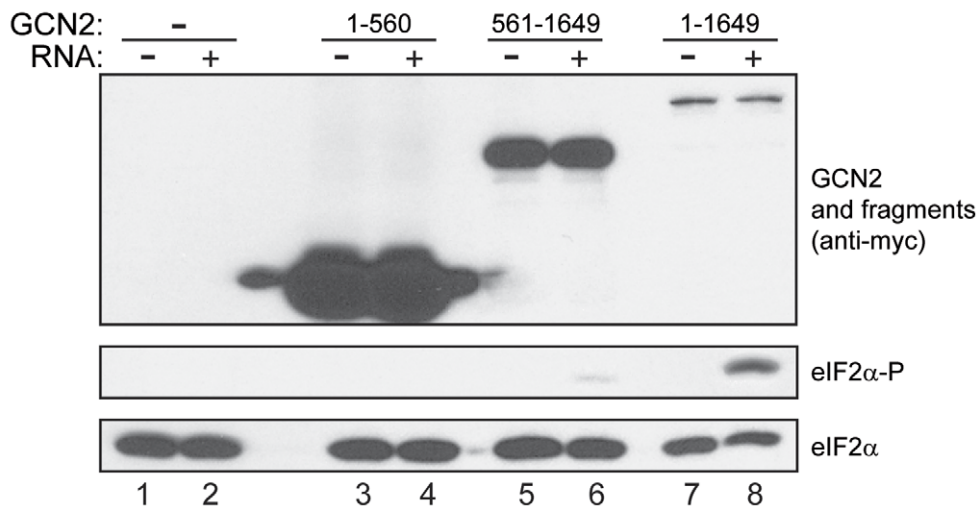
A**B****C**

Figure 3. HIV-1 cleavage inhibits GCN2 eIF2alpha kinase activity. (A) Affinity purified human GCN2 was incubated for 30 min at 30°C in the absence or the presence of HIV-1^{Pro} and in the absence or the presence of 2.5 μM SQ, as indicated, prior to being assayed in an eIF2alpha kinase assay (lanes 1–5). In lane 6, SQ was added after incubation of GCN2 with the protease, just before initiating the eIF2alpha kinase assay. HIV-1 RNA was only present during the kinase assay. Incubation was stopped by addition of SDS-PAGE sample buffer and proteins were analyzed by western blot using specific antisera to detect eIF2alpha phosphorylated on serine 51, total eIF2alpha, and phosphorylated and total GCN2. Similar results were obtained from a duplicate experiment. (B) Schematic representation of the structural domains of human GCN2 and the generated GCN2 fragments according to the HIV-1^{Pro} cleavage site. The 1649 amino acid GCN2 sequence is illustrated by a larger box and the figure is drawn to scale. Highlighted domains include the N-terminal (black); the ‘Pseudokinase’ (dark grey) that is related to sub-domains I–XI of eukaryotic protein kinases; the conserved two lobes of the eIF2alpha kinase domain (black), separated by a large insert (light grey); the HisRS-like domain (dark grey); and a C-terminal domain (light grey). The numbers refer to the amino acid residues. (C) In vitro eIF2alpha kinase assay of purified full-length human GCN2 (1–1649) and the generated GCN2 fragments according to the HIV-1^{Pro} cleavage site (1–560 and 561–1649) in the absence or the presence of HIV-1 RNA as indicated. Proteins were analyzed by western blot using specific antisera to detect eIF2alpha phosphorylated on serine 51, total eIF2alpha, and full-length GCN2 or fragments (anti-myc). Similar results were obtained from a duplicate experiment.

doi:10.1371/journal.pone.0047272.g003

expression between wild type and GCN2 knock out cells, and in BHK-21 cells (control and over-expressing an eIF2alpha phosphatase activator) in which PKR expression is extremely low compared with other cell types [28]. Thus, the absence of GCN2 in normal cells or the maintenance of low levels of phosphorylated eIF2alpha in cells with a very low presence of PKR favors the expression of HIV-1 proteins.

The relevance of PKR activation and eIF2alpha phosphorylation in HIV-1 protein expression and viral cycle progression is illustrated by a number of countermeasures employed by the virus to prevent PKR response, including viral products and cellular proteins [17]. Therefore, PKR is inhibited by the presence of large amounts of viral TAR RNA and by binding of the HIV-1 Tat protein [29], but also by direct interaction with two cellular RNA binding proteins, the TAR RNA binding protein (TRBP) [30] and adenosine deaminase acting on RNA 1 (ADAR1) [27,31]. These mechanisms seem to make the innate antiviral response ineffective and allow the virus to replicate in permissive cells. Here we show that in cells (MT-2 and PBMC) infected with HIV-1, GCN2 is proteolytically degraded and that its proteolytic cleavage is prevented by the presence of the specific inhibitor of HIV-1^{Pro} saquinavir. Moreover, the presence of saquinavir increased eIF2alpha phosphorylation, probably due to the activation of uncleaved GCN2. Since GCN2 levels seem to increase with PHA treatment and HIV-1 infection, we can speculate that activation of cells and HIV-1 infection can promote the establishment of an antiviral state that includes GCN2 activation and eIF2alpha phosphorylation, being in part counteracted by the proteolytic degradation of GCN2. These findings are consistent with previous reports showing that HIV-1^{Pro} cleaves other proteins involved in the regulation of protein synthesis, such as the translation initiation factors eIF4GI and PABP [20,24]; this cleavage inhibits cellular protein synthesis, but allows translation of viral RNA [32] which in turn also needs active eIF2alpha. In good agreement with these observations, is the fact that during HIV-1 infection the breakage of GCN2 showed kinetics coinciding with those observed for eIF4GI.

Our results demonstrate that HIV-1^{Pro} cleavage of GCN2 renders an inactive eIF2alpha kinase, although, according to the break site identified, the C-terminal portion of the protein retains the eIF2alpha kinase and HisRS-related domains, responsible for the activity and the activation of the protein, respectively. In fact, it seems that this fragment has some residual activity compared to the full-length protein. This apparent discrepancy could be explained by the possible existence of an additional minor cleavage site in the kinase or the HisRS-related domain. Due to the low sequence identity between HIV-1^{Pro} known substrates and also to the lack of an obvious consensus cleavage motif [33,34], it is difficult to say if GCN2 is a good substrate for the viral protease, although the cleavage site in GCN2 meets the apparent

requirement of hydrophobic amino acids. Our results in HeLa cell-free extracts showed that GCN2 was completely broken after 15 min of protease treatment, whereas after 30 min significant amounts of eIF4GI and, especially, PABP remained intact, suggesting that GCN2 is an excellent substrate for the protease and that its specific breakage could favor HIV-1 cell cycle progression.

All these findings taken together would point to the following plausible scenario for the role of GCN2 in the antiviral response against HIV-1: in the late phase of the viral life cycle, when there is a huge production of viral mRNA to be translated into proteins for virion assembly and maturation, viral RNAs could activate GCN2, which subsequently would phosphorylate eIF2alpha, leading to the inhibition of viral protein synthesis. The translation of some viral mRNAs brings about the appearance of HIV-1^{Pro}, which inactivates GCN2 by proteolytic cleavage, preventing phosphorylation of eIF2alpha and allowing the translation of viral proteins and the progression of the viral cycle. It is possible that the discovery of specific activators of GCN2 could help prevent virus replication and the spread of infection.

Materials and Methods

Plasmids and in vitro transcription

The pTM1-HIV-1 PR plasmid containing a cDNA fragment encoding the gene of HIV-1 protease in the pTM1 vector [35] has been described previously [20]. The plasmids pT7SV-HIV-1PR, pT7SV-2Apro and pT7SVwt were also described previously [25]. The cDNA containing the entire open reading frame of human GCN2 was subcloned into the plasmid pcDNA3.1/Myc-His (Invitrogen) by PCR amplification combined with restriction endonuclease cuts from different cDNA partial clones. This cDNA was used to generate the plasmids encoding the fragments of human GCN2 corresponding to amino acids 1–560 and 561–1649. The plasmids pGST-mGCN2 (419–1024) and pGST-hGCN2 (525–1024) were constructed by cloning the PCR-amplified cDNA fragments encoding the amino acids 419 to 1024 of mouse GCN2 and 525 to 1024 of human GCN2, respectively, into the plasmid pGEX-4T (GE Healthcare). The HIV-1 cDNA cloned into the plasmid pBH10 [36] was subcloned into the plasmid BlueScript KS (+/–) (Stratagene) in order to allow its transcription from a T7 promoter (pBS-HIV-1).

Plasmids pT7SV-HIV-1PR, pT7SV-2Apro, pT7SVwt and pBS-HIV-1 were linearized and in vitro transcribed using the T7 RNA polymerase kit (Promega) in order to produce capped recombinant genomic Sindbis virus (SV) mRNAs and genomic-length HIV-1 RNA.

The following reagent was obtained through the AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH: pNL4-3.Luc.R-E- from Dr. Nathaniel Landau [37,38]. An equivalent construct in which the firefly luciferase gene

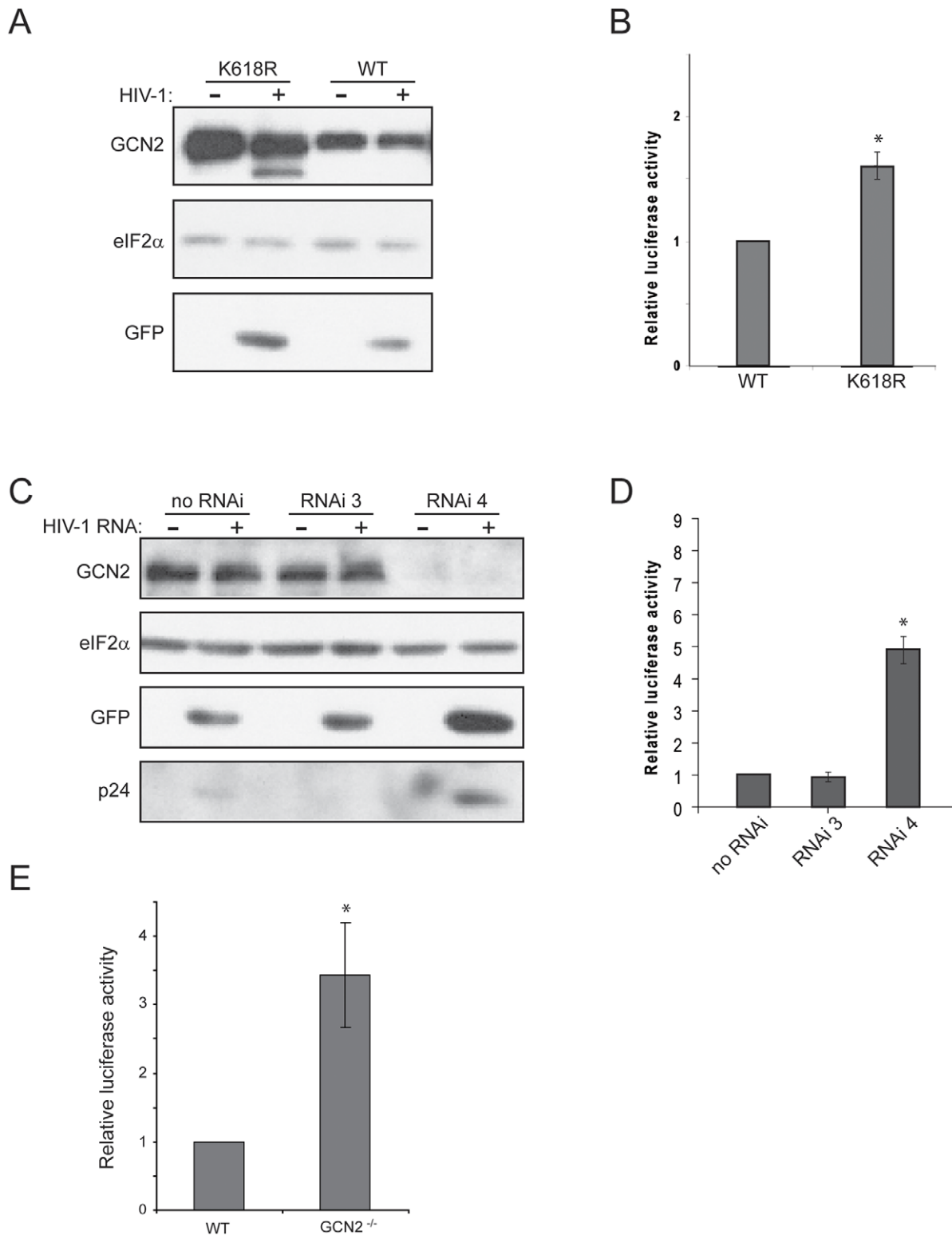


Figure 4. Absence of GCN2 favor HIV-1 protein expression. (A, B) HeLa cells were co-transfected with plasmids encoding wild type GCN2 or the inactive mutant GCN2-K618R and also with a mixture of HIV-1 encoding plasmids pNL4-3.Luc.R-E- and pNL4-3.GFP.R-E-. Cells were harvested 24 h after transfection. Aliquots of cell lysates containing equal amounts of proteins were analyzed by western blot using specific antisera to detect GCN2, eIF2 α and GFP (A). Luciferase activity was measured, and results are shown as the ratio between the activity in cells over-expressing GCN2-K618R mutant and in cells over-expressing wild type GCN2. * $P < 0.05$ vs. WT (B). (C, D) Normal HeLa cells (no siRNA) and HeLa cells stably expressing a control siRNA (siRNA 3) or a specific siRNA for GCN2 knock down (siRNA 4) were transiently transfected with a mixture of HIV-1 encoding plasmids, pNL4-3.Luc.R-E- and pNL4-3.GFP.R-E-. Cells were harvested 24 h after transfection. Aliquots of cell lysates containing equal amounts of proteins were analyzed by western blot using specific antisera to detect GCN2, eIF2 α , GFP and HIV-1-p24 (C). Luciferase activity was also measured, and results are shown as the ratio between the activity in cells expressing siRNA 3 or siRNA 4 and in normal cells (no siRNA). * $P < 0.01$ vs. no RNAi and RNAi 3 (D).

(E) Wild type (WT) and GCN2 knock out (GCN2^{-/-}) MEF were transiently transfected by electroporation with a pcDNA-based plasmid encoding luciferase protein (pcDNA-Luc), as a control, or with an HIV-1 encoding plasmid, pNL4-3.Luc.R-E-. Cells were harvested 24 h after transfection and luciferase activity was measured in cell extracts. Luciferase activity produced in cells from the HIV-1-encoding plasmid was normalized dividing it by the activity produced in cells from pcDNA-Luc plasmid. Results represent the ratio of normalized luciferase activity between wild type MEFs (set as one) and GCN2^{-/-}. * $P < 0.005$ vs. WT. Results represent the mean of three to four independent experiments and error bars indicate the standard error (SE).

doi:10.1371/journal.pone.0047272.g004

was replaced by the green fluorescent protein (GFP) gene (pNL4-3.GFP.R-E-), was kindly supplied by Dr. Gustavo del Real (Centro Nacional de Biotecnología, Madrid, Spain).

Cell culture, virus infection and transfection

MEF wild type, GCN2 knock out [39] or with a homozygous knock-in mutation for eIF2 α (S51A) [40], HeLa, COS-7,

BHK-21 and HEK 293T cell lines were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% (v/v) foetal bovine serum (FBS), 2 mM glutamine, antibiotics and non-essential amino acids. MT-2 cells (human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1)-infected cell line) were maintained in complete RPMI 1640 growth medium (Biochrom AG) supplemented with 5% FBS, 2 mM glutamine, 1% ampicillin, 1% cloxacillin, 0.32% gentamicin. Human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC)

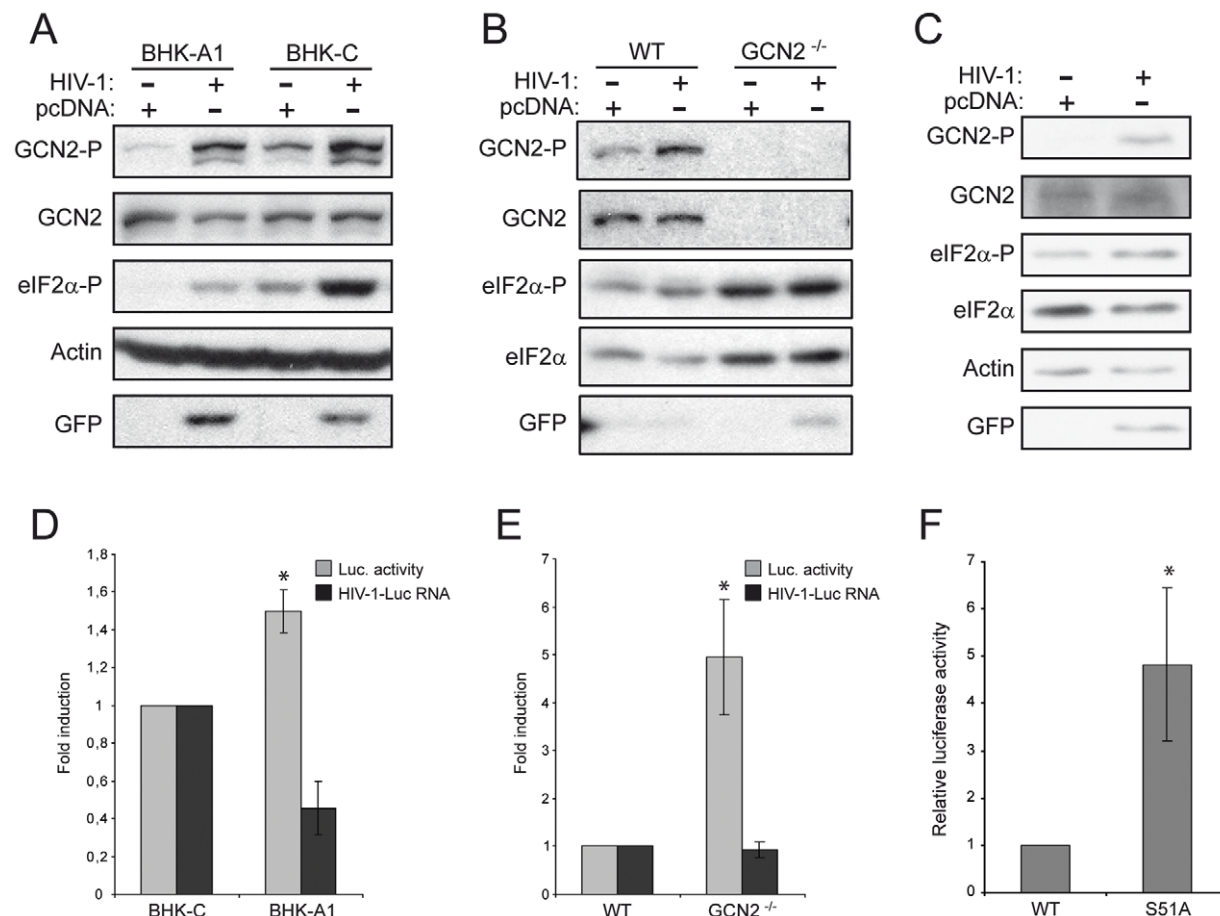


Figure 5. GCN2 is activated in cells expressing HIV-1 RNA. (A) BHK-C and BHK-A1 cells were transfected with a pcDNA-based plasmid encoding luciferase protein (pcDNA-Luc) or with a mixture of HIV-1 encoding plasmids, pNL4-3.Luc.R-E- and pNL4-3.GFP.R-E-. Aliquots of cell lysates containing equal amounts of proteins were analyzed by western blot using specific antisera to detect eIF2 α phosphorylated on serine 51, phosphorylated or total GCN2, GFP and actin. (B) The same as in (A), but using wild type (WT) and GCN2 knock out (GCN2^{-/-}) MEFs. The membrane was probed with different antisera to detect eIF2 α phosphorylated on serine 51, total eIF2 α , phosphorylated or total GCN2 and GFP. (C) The same as in (A) and (B), but using HeLa cells. In this case the transfection was done by electroporation. The membrane was probed with different antisera to detect eIF2 α phosphorylated on serine 51, total eIF2 α , phosphorylated or total GCN2, GFP and actin. Similar results were obtained from duplicate experiments. (D and E) In samples equivalent to those of the experiments described in (A) and (B) where cells were transfected with pNL4-3.Luc.R-E- plasmid, luciferase activity was measured and HIV-1 RNA quantified. Relative values of both are shown as the ratio between GCN2^{-/-} MEFs or BHK-A1 and the corresponding control cells (wild type MEFs or BHK-C), whose value was set as one. Data are expressed as mean \pm SE. * $P < 0.05$ vs. BHK-C (D) or WT (E). (F) Wild type (WT) and S51A MEFs were transiently transfected by electroporation with a pcDNA-based plasmid encoding luciferase protein (pcDNA-Luc), as a control, or with an HIV-1 encoding plasmid, pNL4-3.Luc.R-E-. Cells were harvested 24 hr after electroporation and luciferase activity was measured in cell extracts. Luciferase activity produced in cells from the HIV-1-encoding plasmid was normalized dividing it by the activity produced in cells from pcDNA-Luc plasmid. Results represent the ratio of normalized luciferase activity between wild type MEFs (set as one) and S51A MEFs. * $P < 0.01$ vs. WT.

doi:10.1371/journal.pone.0047272.g005

were derived from healthy voluntary donors, and obtained from leukophoresed blood by FicollTM gradient (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) and elutriated by centrifugation. After washing with phosphate buffered saline (PBS), cells were seeded in RPMI 1640 medium (Biochrom AG) with 10% FBS, 1% L-glutamine, antibiotics, and 50 IU/ml IL-2. PBMC were stimulated for 48 h with phytohemagglutinine (2 µg/ml) and interleukin 2 (IL-2) (100 IU/ml). All cell lines were cultured at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. PBMC were kindly provided by the Spanish HIV BioBank integrated in the Spanish AIDS Research Network (RIS) 1 [41].

PBMC and MT-2 cells were infected or mock-infected with 10 or 100 ng of p24^{gag} per 10⁶ cells of HIV-1_{NL4-3} for 2 h (100 ng of p24^{gag} per 10⁶ cells has been evaluated to be equivalent to 1–2 viral particles per cell) [42], washed three times and incubated in fresh medium. At 1 to 5 days post-infection (dpi), cells were harvested and washed 3 times with PBS, and the dry pellet was stored at –80°C before lysis.

BHK-21 cells were electroporated with 30 µg of recombinant SV genomic RNA in a final volume of 50 µl as described in [25]. Electroporated cells were maintained in growth medium, and, at 4 h post-electroporation, metabolically labelled with [³⁵S]Met/Cys mixture (Promix, Amersham), as described previously [14] and lysed in sample buffer. Coupled infection/DNA transfection of COS-7 cells with recombinant vaccinia virus (vvT7), pTM1-derived plasmids and plasmids encoding human and mouse GCN2, have previously been described in detail [43].

For transient transfections, HEK 293T and HeLa cells were plated on 60-mm dishes and transfected with plasmids (6–12 µg/dish) using LipofectamineTM and PlusTM Reagents (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Similarly, BHK-21 and MEF cells were transfected using the cationic polymer reagent jetPEITM (PolyPlus-transfection) according to the manufacturer's instructions.

Virus production and titration

Virus stocks were prepared by amplification of HIV-1_{NL4-3} in MT-2 cell line (ATCC) or PHA+IL-2 activated PBMC. Physical titers of viral stocks were evaluated by quantification of HIV p24^{gag} by ELISA kit (Innotest HIV-1 antigen mAb; Innogenetics) [44].

Lentivirus and stable transduction of shRNAs

The following targeted shRNAs in lentiviral construct plasmid pLKO.1-Puro [45] were purchased from Sigma-Aldrich: GCN2 (XM_496066) Clone 1 TRCN0000078648, Clone 2 TRCN0000078649, Clone 3 TRCN0000078650, Clone 4 TRCN0000078651, Clone 5 TRCN0000078652. Lentiviruses were produced by co-transfection of HEK293T Phoenix cells with pLKO.1-Puro shRNA-encoding plasmids, pMD2G (Addgene) and pSPAX2 (Addgene), using jetPEITM (PolyPlus-transfection). Viruses were harvested at 24 and 48 h post-transfection and infections of HeLa cells were carried out in the presence of 8 µg/ml of polybrene (Sigma-Aldrich). Following transduction, cells were selected with 1 µg/ml puromycin (Sigma-Aldrich).

Protein purification

For purification of GST fusion proteins, *Escherichia coli* BL21 cells were transformed with plasmids pGST-mGCN2 (419–1024) and pGST-hGCN2 (525–1024), lysed by sonication, and the fusion proteins were then purified as previously described [46] using glutathione-sepharose (GE Healthcare). Purification of Myc- and 6xHis-tagged GCN2 full-length, GCN2-K618R, GCN2-m2 and GCN2 fragments was done as previously described [14]. HIV-1^{Pro} was provided by I. Pichova through the Centralised Facility

for AIDS Reagents. Purified HIV-2 protease (HIV-2^{Pro}) [47] was obtained through the NIH (National Institutes of Health) AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID (National Institute of Allergy and Infectious Diseases), NIH, Bethesda, MD, U.S.A., from Dr Bret Shirley and Mr Michael Cappola (Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals).

Protease cleavage assays

Crude HeLa S10 extracts were incubated with 2.5 ng/µl of recombinant HIV-1^{Pro} and reactions were stopped by adding sample buffer. In other experiments, purified preparations of mouse or human Myc- and 6xHis-tagged GCN2 were incubated with 2.5 ng/µl of recombinant HIV-1^{Pro}, or HIV-2^{Pro} in cleavage buffer (50 mM sodium phosphate, pH 6.0, 25 mM NaCl, 5 mM EDTA and 1 mM DTT) for 3 h at 30°C. In order to map the cleavage sites of HIV-1^{Pro} on GCN2, 50 µg of recombinant GST-tagged mouse or human GCN2 protein were incubated with 1 µg of recombinant HIV-1^{Pro} in a total volume of 50 µl for 3 h at 30°C in cleavage buffer. Cleavage products were separated by SDS-PAGE, transferred to a PVDF membrane (Immobilon[®]-P, Millipore) and then subjected to automated Edman degradation with an Applied Biosystems Procise Sequencer in the Proteomics Service of Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC).

In vitro kinase activity

Affinity purified GCN2 wild type and mutants (m2 and K618R) were assayed for their ability to phosphorylate eIF2α in the presence or the absence of HIV-1 RNA, as previously described [14]. In some experiments ³²P-γ-ATP was included in the kinase reaction mix and phosphorylated eIF2α was detected by autoradiography of the corresponding SDS-PAGE dried gel. In other kinase assays only non-radioactive ATP was used and phosphorylated eIF2α and GCN2 were detected by western blot using phosphospecific antibodies.

Western blotting

Proteins subjected to SDS-PAGE were transferred to a PVDF membrane (Immobilon[®]-P, Millipore) for western blot analysis. Western blots were performed using the following antibodies: mouse anti-myc (Sigma); rabbit anti-eIF2α phospho-Ser51 (Cell Signaling); rabbit anti-eIF2α (Santa Cruz); rabbit anti-GCN2 phospho-Thr898 (Cell Signaling, Abcam); rabbit anti-GCN2 [8]; eIF4G1 anti-serum raised against peptides derived from the C-terminal region of the human eIF4G1 [43]; rabbit antisera raised against the C- and N-terminal region of human PABP [48]; and mouse ascites of a monoclonal antibody against HIV-1 p24 antigen (Centralised Facility for AIDS Reagents, NIBSC, Potters Bar, Herts., U.K.). Goat anti-(rabbit IgG) and goat anti-(mouse IgG) antibodies coupled to peroxidase (Promega) were also used. Immunoreactive bands were visualized by using ECLTM and ECL Plus Western Blotting Detection Systems (GE Healthcare) and autoradiography (Agfa Curix RP2 Plus).

Luciferase activity determination

After different times post-transfection, cells were washed twice with PBS and lysed using Passive Lysis Buffer (Promega). After removal of cell debris, equal amounts of total protein were used to measure luciferase activity (Luciferase Assay System, Promega) in the lysates.

RNA extraction, reverse transcription and real-time PCR

Total RNA was extracted using the SV Total RNA Isolation System (Promega), following the manufacturer's instructions. For

determination of luciferase mRNA expression, 1 µg of total RNA was reverse-transcribed in a 20 µl reaction mixture by using a Reverse Transcription System (Promega) and random primers following the manufacturer's instructions. The LightCycler® FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I system (Roche) was used for real-time PCR amplification/quantification using 2 µl of first strand cDNA reaction as a template. The level of GAPDH mRNA in each sample was determined in order to normalize for differences in total RNA amounts. The data were derived from at least three independent reverse-transcription reactions and real-time PCR performed in duplicate. Data analysis to determine relative luciferase mRNA expression was performed according to the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [49]. Primers were designed to amplify fragments in the open reading frame of luciferase (nucleotides 1343–1540) and GAPDH (nucleotides 493–775).

Statistical Analysis

All data are reported as means \pm SE of the results obtained from at least three independent experiments. Data were analyzed by two-tailed, unpaired Student's *t* test. Differences were considered significant when $P < 0.05$.

Supporting Information

Figure S1 GCN2 and PKR expression and eIF2alpha kinase response in BHK-C and BHK-A1 cells. (A) BHK-C and BHK-A1 cells were maintained for 1 h in normal growth

medium containing or not thapsigargin (Tg) or in growth medium without methionine (-Met). Aliquots of cell lysates containing equal amounts of proteins were resolved into 10% SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane. The membrane was probed with different antisera to detect eIF2alpha phosphorylated on serine 51, phosphorylated or total GCN2 and actin. (B) BHK-C and BHK-A1 cells or wild type (WT), GCN2 knock out (GCN2^{-/-}) and PKR knock out (PKR^{-/-}) MEFs were maintained in normal growth medium before lysis. Aliquots of cell extracts containing equal amount of proteins were resolved into 10% SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane. The membrane was probed with different antisera to detect GCN2, PKR and actin. Results are representative of at least three independent experiments. (TIF)

Acknowledgments

We thank José Alcalde for excellent technical assistance. HIV-1 protease from I. Pichova was provided by the EU Programme EVA Centre for AIDS Reagents, NIBSC, UK (AVIP Contract Number LSHP-CT-2004-503487).

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JDP JIJ CDH JJB. Performed the experiments: JDP JIJ JJB. Analyzed the data: JDP JIJ CDH JJB. Contributed reagents/materials/analysis tools: IV AC MAM-F. Wrote the paper: JJB.

References

- Harding HP, Zhang Y, Ron D (1999) Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* 397: 271–274.
- de Haro C, Mendez R, Santoyo J (1996) The eIF-2alpha kinases and the control of protein synthesis. *FASEB J* 10: 1378–1387.
- Chen JJ, London IM (1995) Regulation of protein synthesis by heme-regulated eIF-2 alpha kinase. *Trends Biochem Sci* 20: 105–108.
- Berlanga JJ, Herrero S, de Haro C (1998) Characterization of the heminsensitive eukaryotic initiation factor 2alpha kinase from mouse nonerythroid cells. *J Biol Chem* 273: 32340–32346.
- Proud CG (1995) PKR: a new name and new roles. *Trends Biochem Sci* 20: 241–246.
- Berlanga JJ, Santoyo J, De Haro C (1999) Characterization of a mammalian homolog of the GCN2 eukaryotic initiation factor 2alpha kinase. *Eur J Biochem* 265: 754–762.
- Deng J, Harding HP, Raught B, Gingras AC, Berlanga JJ, et al. (2002) Activation of GCN2 in UV-irradiated cells inhibits translation. *Curr Biol* 12: 1279–1286.
- Harding HP, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R, et al. (2000) Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell* 6: 1099–1108.
- Santoyo J, Alcalde J, Mendez R, Pulido D, de Haro C (1997) Cloning and characterization of a cDNA encoding a protein synthesis initiation factor-2alpha (eIF-2alpha) kinase from *Drosophila melanogaster*. Homology To yeast GCN2 protein kinase. *J Biol Chem* 272: 12544–12550.
- Pomar N, Berlanga JJ, Campuzano S, Hernandez G, Elias M, et al. (2003) Functional characterization of *Drosophila melanogaster* PERK eukaryotic initiation factor 2alpha (eIF2alpha) kinase. *Eur J Biochem* 270: 293–306.
- Hinnebusch AG (1997) Translational regulation of yeast GCN4. A window on factors that control initiator-tRNA binding to the ribosome. *J Biol Chem* 272: 21661–21664.
- Zhan K, Vattam KM, Bauer BN, Dever TE, Chen JJ, et al. (2002) Phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2 by heme-regulated inhibitor kinase-related protein kinases in *Schizosaccharomyces pombe* is important for resistance to environmental stresses. *Mol Cell Biol* 22: 7134–7146.
- Wek SA, Zhu S, Wek RC (1995) The histidyl-tRNA synthetase-related sequence in the eIF-2 alpha protein kinase GCN2 interacts with tRNA and is required for activation in response to starvation for different amino acids. *Mol Cell Biol* 15: 4497–4506.
- Berlanga JJ, Ventoso I, Harding HP, Deng J, Ron D, et al. (2006) Antiviral effect of the mammalian translation initiation factor 2alpha kinase GCN2 against RNA viruses. *EMBO J* 25: 1730–1740.
- Garcia MA, Gil J, Ventoso I, Guerra S, Domingo E, et al. (2006) Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to antiproliferative action. *Microbiol Mol Biol Rev* 70: 1032–1060.
- Balvay L, Lopez Lastra M, Sargueil B, Darlix JL, Ohlmann T (2007) Translational control of retroviruses. *Nat Rev Microbiol* 5: 128–140.
- Clerzius G, Gelinas JF, Gagnon A (2011) Multiple levels of PKR inhibition during HIV-1 replication. *Rev Med Virol* 21: 42–53.
- Prevot D, Darlix JL, Ohlmann T (2003) Conducting the initiation of protein synthesis: the role of eIF4G. *Biol Cell* 95: 141–156.
- Alvarez E, Menendez-Arias L, Carrasco L (2003) The eukaryotic translation initiation factor 4G1 is cleaved by different retroviral proteases. *J Virol* 77: 12392–12400.
- Ventoso I, Blanco R, Perales C, Carrasco L (2001) HIV-1 protease cleaves eukaryotic initiation factor 4G and inhibits cap-dependent translation. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 12966–12971.
- Ohlmann T, Prevot D, Decimo D, Roux F, Garin J, et al. (2002) In vitro cleavage of eIF4GI but not eIF4GII by HIV-1 protease and its effects on translation in the rabbit reticulocyte lysate system. *J Mol Biol* 318: 9–20.
- Joachims M, Van Breugel PC, Lloyd RE (1999) Cleavage of poly(A)-binding protein by enterovirus proteases concurrent with inhibition of translation in vitro. *J Virol* 73: 718–727.
- Kuyumcu-Martinez NM, Joachims M, Lloyd RE (2002) Efficient cleavage of ribosome-associated poly(A)-binding protein by enterovirus 3C protease. *J Virol* 76: 2062–2074.
- Alvarez E, Castello A, Menendez-Arias L, Carrasco L (2006) HIV protease cleaves poly(A)-binding protein. *Biochem J* 396: 219–226.
- Castello A, Sanz MA, Molina S, Carrasco L (2006) Translation of Sindbis virus 26S mRNA does not require intact eukaryotic initiation factor 4G. *J Mol Biol* 355: 942–956.
- Garcia MA, Meurs EF, Esteban M (2007) The dsRNA protein kinase PKR: virus and cell control. *Biochimie* 89: 799–811.
- Clerzius G, Gelinas JF, Daher A, Bonnet M, Meurs EF, et al. (2009) ADAR1 interacts with PKR during human immunodeficiency virus infection of lymphocytes and contributes to viral replication. *J Virol* 83: 10119–10128.
- Ventoso I, Berlanga JJ, Almendral JM (2010) Translation control by protein kinase R restricts minute virus of mice infection: role in parvovirus oncolysis. *J Virol* 84: 5043–5051.
- Maitra RK, McMillan NA, Desai S, McSwiggan J, Hovanessian AG, et al. (1994) HIV-1 TAR RNA has an intrinsic ability to activate interferon-inducible enzymes. *Virology* 204: 823–827.
- Benkirane M, Neuveut C, Chun RF, Smith SM, Samuel CE, et al. (1997) Oncogenic potential of TAR RNA binding protein TRBP and its regulatory interaction with RNA-dependent protein kinase PKR. *EMBO J* 16: 611–624.
- Gelinas JF, Clerzius G, Shaw E, Gagnon A (2011) Enhancement of replication of RNA viruses by ADAR1 via RNA editing and inhibition of RNA-activated protein kinase. *J Virol* 85: 8460–8466.

32. Castello A, Franco D, Moral-Lopez P, Berlanga JJ, Alvarez E, et al. (2009) HIV-1 protease inhibits Cap- and poly(A)-dependent translation upon eIF4G1 and PABP cleavage. *PLoS One* 4: e7997.
33. Li X, Hu H, Shu L (2010) Predicting human immunodeficiency virus protease cleavage sites in nonlinear projection space. *Mol Cell Biochem* 339: 127–133.
34. Perez MA, Fernandes PA, Ramos MJ (2010) Substrate recognition in HIV-1 protease: a computational study. *J Phys Chem B* 114: 2525–2532.
35. Elroy-Stein O, Fuerst TR, Moss B (1989) Cap-independent translation of mRNA conferred by encephalomyocarditis virus 5' sequence improves the performance of the vaccinia virus/bacteriophage T7 hybrid expression system. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 6126–6130.
36. Ratner L, Haseltine W, Patarca R, Livak KJ, Starcich B, et al. (1985) Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III. *Nature* 313: 277–284.
37. Connor RI, Chen BK, Choe S, Landau NR (1995) Vpr is required for efficient replication of human immunodeficiency virus type-1 in mononuclear phagocytes. *Virology* 206: 935–944.
38. He J, Choe S, Walker R, Di Marzio P, Morgan DO, et al. (1995) Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R (Vpr) arrests cells in the G2 phase of the cell cycle by inhibiting p34cdc2 activity. *J Virol* 69: 6705–6711.
39. Harding HP, Zhang Y, Zeng H, Novoa I, Lu PD, et al. (2003) An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell* 11: 619–633.
40. Scheuner D, Song B, McEwen E, Liu C, Laybutt R, et al. (2001) Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis. *Mol Cell* 7: 1165–1176.
41. Garcia-Merino I, de Las Cuevas N, Jimenez JL, Gallego J, Gomez C, et al. (2009) The Spanish HIV BioBank: a model of cooperative HIV research. *Retrovirology* 6: 27.
42. Gordon-Alonso M, Sala-Valdes M, Rocha-Perugini V, Perez-Hernandez D, Lopez-Martin S, et al. (2012) EWI-2 Association with alpha-Actinin Regulates T Cell Immune Synapses and HIV Viral Infection. *J Immunol* 189: 689–700.
43. Aldabe R, Feduchi E, Novoa I, Carrasco L (1995) Efficient cleavage of p220 by poliovirus 2Apro expression in mammalian cells: effects on vaccinia virus. *Biochem Biophys Res Commun* 215: 928–936.
44. Chonco L, Pion M, Vacas E, Rasines B, Maly M, et al. (2012) Carbosilane dendrimer nanotechnology outlines of the broad HIV blocker profile. *J Control Release* 161: 949–958.
45. Stewart SA, Dykxhoorn DM, Palliser D, Mizuno H, Yu EY, et al. (2003) Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells. *RNA* 9: 493–501.
46. Khaleghpour K, Kahvejian A, De Crescenzo G, Roy G, Svitkin YV, et al. (2001) Dual interactions of the translational repressor Paip2 with poly(A) binding protein. *Mol Cell Biol* 21: 5200–5213.
47. Rittenhouse J, Turon MC, Helfrich RJ, Albrecht KS, Weigl D, et al. (1990) Affinity purification of HIV-1 and HIV-2 proteases from recombinant *E. coli* strains using pepstatin-agarose. *Biochem Biophys Res Commun* 171: 60–66.
48. Imataka H, Gradi A, Sonenberg N (1998) A newly identified N-terminal amino acid sequence of human eIF4G binds poly(A)-binding protein and functions in poly(A)-dependent translation. *EMBO J* 17: 7480–7489.
49. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method. *Methods* 25: 402–408.